

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533211

(P2004-533211A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 135 頁) 最終頁に続く		

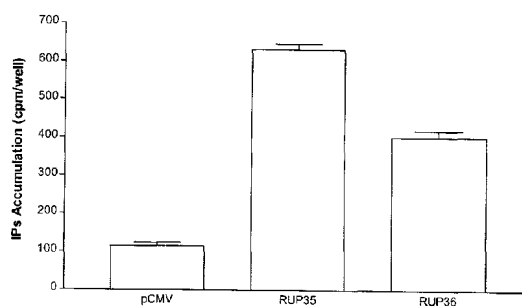
(21) 出願番号	特願2002-545166 (P2002-545166)	(71) 出願人	500478097
(86) (22) 出願日	平成13年11月26日 (2001.11.26)		アリーナ・フアーマシユーチカルズ・イン
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月26日 (2003.5.26)		コーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044386		アメリカ合衆国カリフォルニア州9212
(87) 国際公開番号	W02002/042461		1 サンディエゴ・ナンシーリツジドライブ
(87) 国際公開日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		6166
(31) 優先権主張番号	60/253,404	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成12年11月27日 (2000.11.27)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/255,366		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成12年12月12日 (2000.12.12)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/270,266		
(32) 優先日	平成13年2月20日 (2001.2.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトGタンパク質共役レセプターの内因性バージョンおよび非内因性バージョン

(57) 【要約】

本特許文書において開示する本発明は、膜貫通型レセプターに関し、より詳細には、内因性リガンドが未知であるヒトGタンパク質共役レセプター、および構成的活性の証拠のある変異（非内因性）バージョンのヒトGPCRに関する。本発明によって、この特定のアミノ酸配列を有するGタンパク質共役レセプターおよびその構成的活性化バージョンが提供される。本発明によって、このヒトGタンパク質共役レセプターをコードするcDNAおよびベクターを含むプラスミドもまた提供される。本発明によって、このプラスミドを含む宿主細胞もまた提供される。

IP3 Assay in 293 Cells



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 3】

ベクターおよび配列番号 1 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 5】

配列番号 4 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 7】

ベクターおよび配列番号 3 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 9】

配列番号 6 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 11】

ベクターおよび配列番号 5 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 13】

配列番号 8 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 15】

ベクターおよび配列番号 7 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 17】

配列番号 10 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 19】

ベクターおよび配列番号 9 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 21】

配列番号 12 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 23】

ベクターおよび配列番号 11 の c D N A を含む、プラスミド。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

請求項 23 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 25】

配列番号 14 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 27】

ベクターおよび配列番号 13 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 29】

配列番号 16 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 31】

ベクターおよび配列番号 15 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 32】

請求項 31 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 33】

配列番号 18 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 34】

請求項 33 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 35】

ベクターおよび配列番号 17 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 36】

請求項 35 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【請求項 37】

配列番号 20 のアミノ酸配列によってコードされる、G タンパク質共役レセプター。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の G タンパク質共役レセプターの、非内因性の構成的活性化バージョン。

【請求項 39】

ベクターおよび配列番号 19 の c D N A を含む、プラスミド。

【請求項 40】

請求項 39 に記載のプラスミドを含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願に対する引用)

本出願は、米国特許出願番号 09 / 170 , 496 (1998 年 10 月 13 日に米国特許商標庁に提出) およびその対応 P C T 出願番号 P C T / U S 99 / 23938 (2000 年 4 月 20 日に W O 00 / 22129 として公開) の一部継続出願である。本出願は、以下の仮出願からの優先権の利益を請求する (以下の仮出願は、すべて、示された日付に、U . S . E x p r e s s M a i l を介して、米国特許商標庁に提出された) : 米国仮特許出願番号 60 / 253 , 404 (2000 年 11 月 27 日提出) ; 米国仮特許出願番号 60 / 255 , 366 (2000 年 12 月 12 日提出) ; 米国仮特許出願番号 60 / 270 , 286 (2001 年 2 月 20 日提出) ; 米国仮特許出願番号 60 / 282 , 356 (2001 年 4 月 6 日提出) (この仮出願は、米国仮特許出願番号 60 / 270 , 266

10

20

30

40

50

(2001年2月20日提出)からの優先権を主張する);米国仮特許出願番号60/282,032(2001年4月6日提出);米国仮特許出願番号60/282,358(2001年4月6日提出);米国仮特許出願番号60/282,365(2001年4月6日提出);米国仮特許出願番号60/290,917(2001年5月14日提出);米国仮特許出願番号60/309,208(2001年7月31日提出);これらの開示は、その全体が参考として援用される)。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、膜貫通レセプターに関し、いくつかの実施形態においては、Gタンパク質共役レセプターに関し、いくつかの実施形態においては、そのレセプターの構成的活性を確立または増強するように変化した内因性GPCRに関する。いくつかの実施形態において、この構成的活性化GPCRは、治療剤としての適用性を有するレセプターアゴニストまたは逆のアゴニストとしての候補化合物の直接的同定のために使用される。

【0003】

(発明の背景)

多数のレセプタークラスがヒトにおいて存在するが、断然豊富でありかつ治療上適切であるのは、Gタンパク質共役レセプター(GPCR)クラスにより示される。ヒトゲノム中には、約30,000~40,000個の遺伝子が存在することが推定され、これらのうち、約2%がGPCRをコードすると推定される。内因性リガンドが同定されているレセプター(GPCRを含む)は、「既知の」レセプターと呼ばれ、一方、内因性リガンドが同定されていないレセプターは、「オーファン」レセプターと呼ばれる。

【0004】

GPCRは、医薬品の開発のための重要な領域を示す:100個の既知のGPCRのうちの約20個から、処方箋薬剤すべてのうちの約60%が、開発されている。例えば、1999年、トップ100の商品名処方箋薬物のうち、以下の薬物が、GPCRと相互作用する(処置される疾患および/または障害が、括弧中に示される):

Claritin(登録商標)(アレルギー) Prozac(登録商標)(抑鬱) Vasotec(登録商標)(高血圧) Paxil(登録商標)(抑鬱) Zolof(登録商標)(抑鬱) Zyprexa(登録商標)(精神病) Cozaar(登録商標)(高血圧) Imitrex(登録商標)(片頭痛) Zantac(登録商標)(逆流) Propulsid(登録商標)(逆流疾患) Risperdal(登録商標)(精神分裂病) Serevent(登録商標)(喘息) Pepcid(登録商標)(逆流) Gaster(登録商標)(潰瘍) Atrovent(登録商標)(気管支痙攣) Effexor(登録商標)(抑鬱) Depakote(登録商標)(癲癇) Cardura(登録商標)(前立腺肥大) Allegra(登録商標)(アレルギー) Lupron(登録商標)(前立腺癌) Zoladex(登録商標)(前立腺癌) Diprivan(登録商標)(感覚脱失) Buspar(登録商標)(不安) Ventolin(登録商標)(気管支痙攣) Hytrin(登録商標)(高血圧) Wellbutrin(登録商標)(抑鬱) Zyrtec(登録商標)(鼻炎) Plavix(登録商標)(心筋梗塞/発作) Toprol-XL(登録商標)(高血圧) Tenormin(登録商標)(アンギナ) Xalatan(登録商標)(緑内障) Singulair(登録商標)(喘息) Diovan(登録商標)(高血圧) Harnal(登録商標)(前立腺肥大) (Med Ad News 1999 Data)。

【0005】

GPCRは、共通の構造モチーフを共有し、この構造モチーフは、7つのヘリックスを形成する22~24個の疎水性アミノ酸からなる7つの配列を有し、このヘリックスの各々は、膜に広がる(各広がりは、数により同定される。すなわち、膜貫通1(TM-1)、膜貫通2(TM-2)など)。この膜貫通ヘリックスは、膜貫通2と膜貫通3との間、膜貫通4と膜貫通5との間、ならびに膜貫通6と膜貫通7との間で、アミノ酸ストラ

10

20

30

40

50

ドによって、細胞膜の外部（すなわち、「細胞外」側）で連結される（これらは、それぞれ「細胞外」領域1（EC-1）、細胞外領域2（EC-2）、および細胞外領域3（EC-3）と呼ばれる）。この膜貫通ヘリックスはまた、膜貫通1と膜貫通2との間、膜貫通3と膜貫通4との間、ならびに膜貫通5と膜貫通6との間で、アミノ酸ストランドによって、細胞膜の内部（すなわち、「細胞内」側）で連結される（これらは、それぞれ「細胞内」領域1（IC-1）、細胞内領域2（IC-2）、および細胞内領域3（IC-3）と呼ばれる）。このレセプターの「カルボキシ」（「C」）末端は、細胞中の細胞内空間に存在し、そしてこのレセプターの「アミノ」（「N」）末端は、細胞外部の細胞外空間に存在する。

【0006】

一般に、内因性リガンドが、このレセプターに結合した（「しばしば、そのレセプターの「活性化」と呼ばれる）場合、細胞内領域と細胞内「Gタンパク質」との間の共役を可能にする、細胞内領域のコンフォメーション変化が存在する。GPCRは、Gタンパク質に関して「無差別」である、すなわち、GPCRは、1つより多くのGタンパク質と相互作用し得ると、報告されている。Kenakin, T., 43 Life Sciences 1095 (1988)を参照のこと。他のGタンパク質が存在するけれども、現在、 G_q 、 G_s 、 G_i 、 G_z および G_o が、同定されているGタンパク質である。Gタンパク質と共役するリガンド活性化GPCRは、シグナル伝達カスケードプロセス（「シグナル伝達」と呼ばれる）を開始する。通常の条件下では、シグナル伝達は、最終的には、細胞活性化または細胞障害を生じる。理論に拘束されることは望まないが、このレセプターのIC-3ループおよびカルボキシ末端が、Gタンパク質と相互作用すると、考えられる。

【0007】

生理学的条件下で、GPCRは、2つの異なるコンフォメーションである、「不活性」状態と「活性状態」との間で平衡して、細胞膜中に存在する。不活性状態にあるレセプターは、細胞内シグナル伝達経路に連結してシグナル伝達を開始して生物学的応答をもたらすことが、できない。活性状態へとレセプターのコンフォメーションが変化すると、（Gタンパク質を介する）この伝達経路への連結が可能になり、生物学的応答を生じる。

【0008】

レセプターは、リガンドまたは化合物（例えば、薬物）により、活性状態で安定化され得る。最近の発見（このレセプターのアミノ酸配列に対する改変が挙げられるが、排他的には限定しない）により、活性状態のコンフォメーションにこのレセプターを促して安定化させるための、リガンドとも薬物とも異なる手段が、提供される。これらの手段は、このレセプターへのリガンドの結合の効果を模倣することによって、活性状態にてこのレセプターを効果的に安定化させる。このようなリガンド非依存性手段による安定化は、「構成的レセプター活性」と呼ばれる。

【0009】

（発明の要旨）

本明細書中において、内因性バージョンおよび非内因性バージョンのヒトGPCR、ならびにこれらの使用が、開示される。

【0010】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号2のアミノ酸配列によってコードされるGタンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、およびそれを含む宿主細胞に関する。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号1のcDNAを含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【0012】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号4のアミノ酸配列によってコードされるGタンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 3 の c D N A を含むプラスミド、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 1 4 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 6 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 1 5 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 5 の c D N A を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

10

【 0 0 1 6 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 8 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 1 7 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 7 の c D N A を含むプラスミド、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 1 8 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

20

【 0 0 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 9 の c D N A を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その非内因性の構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 1 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 1 1 の c D N A を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

30

【 0 0 2 2 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 1 3 の c D N A を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 4 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

40

【 0 0 2 5 】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 1 5 の c D N A を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 6 】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 2 7 】

50

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 17 の cDNA を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態は、配列番号 20 のアミノ酸配列によってコードされる G タンパク質共役レセプター、その構成的活性化バージョン、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態は、ベクターおよび配列番号 19 の cDNA を含むプラスミド、ならびにそれを含む宿主細胞に関する。

【0030】

10

(詳細な説明)

レセプターに関して発展した科学文献は、レセプターに対する種々の効果を有するリガンドを指すために、多数の用語を採用している。明確さおよび一貫性のために、以下の定義を、本特許出願全体を通して使用する。これらの定義がこれらの用語に関する他の定義と矛盾する程度までは、以下の定義が支配する：

「アゴニスト」とは、レセプターに結合した場合に細胞内応答を活性するか、または膜への GTP の結合を増強する、物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味するものとする。いくつかの実施形態において、「アゴニスト」は、レセプターに結合した場合に細胞内応答を活性化すること、または膜への GTP への結合を増強することが、以前には既知でなかった物質である。

20

【0031】

本明細書中にて使用される「アミノ酸の略語」が、表 A に示される：

表 A

【0032】

【表 1】

アラニン	ALA	A
アルギニン	ARG	R
アスパラギン	ASN	N
アスパラギン酸	ASP	D
システイン	CYS	C
グルタミン酸	GLU	E
グルタミン	GLN	Q
グリシン	GLY	G
ヒスチジン	HIS	H
イソロイシン	ILE	I
ロイシン	LEU	L
リジン	LYS	K
メチオニン	MET	M
フェニルアラニン	PHE	F
プロリン	PRO	P
セリン	SER	S
スレオニン	THR	T
トリプトファン	TRP	W
チロシン	TYR	Y
バリン	VAL	V

10

20

30

【0033】

「アンタゴニスト」とは、アゴニストと同じ部位でレセプターに競合的に結合するが、そのレセプターの活性形態により開始される細胞内応答を活性化せず、それによりアゴニストによる細胞内応答を阻害し得る、物質（例えば、リガンド、候補化合物など）を意味するものとする。アンタゴニストは、アゴニストの非存在下では、ベースライン細胞内応答を減少させない。いくつかの実施形態において、アンタゴニストは、レセプターに結合した場合に細胞内応答を活性化すること、または膜へのGTPの結合を増強することが、以前は既知でなかった物質である。

40

【0034】

「候補化合物」とは、スクリーニング技術を受けることができる分子（例えば、化合物であるが、限定ではない）を意味するものとする。好ましくは、句「候補化合物」は、間接的同定プロセスにより以前に決定された、レセプターに対する逆のアゴニスト、レセプターに対するアゴニスト、またはレセプターに対するアンタゴニストかなる群より選択される、公に公知であった化合物（「間接的に同定された化合物」）を含まない；より好ましくは、少なくとも1つの哺乳動物において治療効力を有すると以前に決定された、間接的に同定された化合物を含まない；最も好ましくは、ヒトにおいて治療効力を有すると以前

50

に決定された、間接的に同定された化合物を含まない。

【0035】

「組成物」とは、少なくとも1つの成分を含む物質を意味するものとする；「薬学的組成物」は、組成物の一例である。

【0036】

「化合物効力」とは、化合物が、レセプター機能を阻害または刺激する能力（すなわち、レセプター結合親和性とは対照的に、シグナル伝達経路を活性化／阻害する能力）の尺度を意味するものとする。化合物効力を検出する例示的手段は、本明細書の実施例の節に開示される。

【0037】

「コドン」とは、リン酸基に結合したヌクレオシド（アデノシン（A）、グアノシン（G）、シチジン（C）、ウリジン（U）およびチミジン（T））を一般的には含み、翻訳されるとアミノ酸をコードする、3つのヌクレオチド（またはヌクレオチド等価物）の分類を意味するものとする。

【0038】

「構成的活性化レセプター」とは、構成的レセプター活性化に供されるレセプターを意味するものとする。構成的活性化レセプターは、内因性であってもまたは非内因性であってもよい。

【0039】

「構成的レセプター活性化」とは、レセプターとそのリガンドまたは化学的リガンド等価物との結合以外の手段によって、活性状態でのレセプターの安定化を意味するものとする。

【0040】

「接触」または「接触する」とは、インビトロ系においてであろうとインビボ系においてであろうと、少なくとも2つの部分を一緒に合わせることを意味するものとする。

【0041】

句「候補化合物」に関連する「直接的に同定する」または「直接的に同定された」とは、構成的活性化レセプター（好ましくは、構成的活性化オーファンレセプター、最も好ましくは、構成的活性化Gタンパク質共役細胞表面オーファンレセプター）に対して候補化合物をスクリーニングし、そしてそのような化合物の化合物効力を評価することを意味するものとする。この句は、いかなる状況においても、句「間接的に同定する」または「間接的に同定された」により包含されるともこの句を包含すると解釈も理解もされるべきではない。

【0042】

「内因性」とは、哺乳動物が天然で産生する物質を意味するものとする。例えば、限定ではないが、用語「レセプター」に関する「内因性」とは、哺乳動物（例えば、限定ではないが、ヒト）またはウイルスによって、天然に産生されることを意味するものとする。対照的に、この文脈における用語「非内因性」とは、哺乳動物（例えば、限定ではないが、ヒト）またはウイルスによって、天然に産生されないことを意味するものとする。例えば、限定ではないが、その内因性形態では構成的に活性ではないが、構成的に活性であるように操作された、レセプターは、最も好ましくは、本明細書中で、「非内因性の、構成的活性化レセプター」と呼ばれる。両方の用語は、「インビボ」系および「インビトロ」系の両方を記載するために使用され得る。例えば、限定ではないが、スクリーニングアプローチにおいて、内因性レセプターまたは非内因性レセプターは、インビトロスクリーニング系に関してであり得る。さらなる例として、限定ではないが、哺乳動物のゲノムが非内因性の構成的活性化レセプターを含むように操作された場合、インビボ系による候補化合物のスクリーニングが、実行可能である。

【0043】

本明細書中に開示される本発明の文脈における「Gタンパク質共役レセプター融合タンパク質」および「GPCR融合タンパク質」とは、各々、少なくとも1つのGタンパク質（

10

20

30

40

50

最も好ましくは、そのような G タンパク質のアルファ () サブユニット (これは、G T P に結合するサブユニットである)) と融合された、内因性の構成的活性化 G P C R または非内因性の構成的活性化 G P C R を含む、非内因性タンパク質を意味し、この G タンパク質は、好ましくは、内因性オファン G P C R と天然で共役する G タンパク質と同じ型である。例えば、限定ではないが、内因性状態で、その G タンパク質「G_s」が、G P C R と共役する優性な G タンパク質である場合、特定の G P C R に基づく G P C R 融合タンパク質は、G_s に融合した G P C R を含む、非内因性タンパク質である；いくつかの状況において、以下に示されるように、非優性 G タンパク質は、G P C R に融合され得る。この G タンパク質は、構成的活性化 G P C R の C 末端に直接的に融合され得るか、またはこの二者の間にスペーサーが存在し得る。

10

【0044】

「宿主細胞」とは、中に組み込まれたプラスミドおよび/またはベクターを有することができる、細胞を意味するものとする。原核生物宿主細胞の場合、プラスミドは、代表的には、宿主細胞が複製するときに自己由来分子として複製する (一般に、このプラスミドは、真核生物宿主細胞中への導入のためにその後単離される) ; 真核生物宿主細胞の場合、プラスミドは、その真核生物宿主細胞が複製した場合にそのプラスミドが複製するように、その宿主細胞の細胞 DNA 中に組み込まれる。いくつかの実施形態において、その宿主細胞は、真核生物宿主細胞であり、より好ましくは、哺乳動物宿主細胞であり、最も好ましくは、293細胞、293T細胞、およびCOS-7細胞からなる群より選択される。

20

【0045】

「間接的に同定する」または「間接的に同定された」とは、薬物発見プロセスへの伝統的アプローチを意味し、このプロセスは、内因性レセプターに特異的な内因性リガンドの同定、そのリガンド-レセプター相互作用を妨害および/または競合する化合物を決定するための、そのレセプターに対する候補化合物のスクリーニング、ならびに活性化レセプターに関連する少なくとも1つのセカンドメッセンジャーに影響することについてその化合物の効力を評価する工程を包含する。

【0046】

「阻害する」または「阻害」とは、用語「応答」に関連して、ある化合物の存在下で、その化合物の非存在下とは対照的に、応答が減少または妨害されることを意味するものとする。

30

【0047】

「逆のアゴニスト」とは、内因性形態のレセプターまたは構成的活性化形態のレセプターのいずれかに結合し、そのレセプターの活性化形態により開始されるベースライン細胞内応答を、アゴニストの非存在下で観察される正常なベースラインレベル活性より低く阻害するかまたは膜へのGTPの結合を減少させる、物質 (例えば、リガンド、候補化合物) を意味するものとする。好ましくは、このベースライン細胞内応答は、その逆のアゴニストの非存在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%、その逆のアゴニスト存在下で阻害される。

40

【0048】

「既知のレセプター」とは、そのレセプターに特異的な内因性リガンドが同定された、内因性レセプターを意味するものとする。

【0049】

「リガンド」とは、天然に存在するレセプターに特異的な分子を意味するものとする。

【0050】

「変異体」または「変異」とは、内因性レセプターの核酸配列および/またはアミノ酸配列に関して、内因性の非構成的活性化レセプターの変異形態がそのレセプターの構成的活性化を示すような、そのような内因性配列に対する特定の変化を意味するものとする。特

50

定の配列に対する等価物に関して、(a) ヒトレセプターの後で変異した形態の構成的活性化のレベルが、そのレセプターの最初の変異により示されるレベルと実質的に同じである場合；および(b) そのレセプターの後で変異した形態と、そのレセプターの最初の変異との間の配列(アミノ酸配列および/または核酸配列)の相同性パーセントが、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%である場合に、そのヒトレセプターの後で変異した形態は、そのヒトレセプターの最初の変異と等価であると思なされる。いくつかの実施形態において、構成的活性化を達成するための本明細書中に開示されるいくつかの好ましいカセットが、そのGPCRの内因性形態と非内因性形態との間で単一アミノ酸変化および/または単一コドン変化を含むという事実が原因で、この配列相同性パーセントは、少なくとも98%であるべきことが、好ましい。

10

【0051】

「非オフアンレセプター」は、同定されたりガンドに特異的な、内因性の天然に存在する分子であって、ここで、レセプターに対するリガンドの結合は、細胞内シグナル伝達経路を活性化し、分子を意味するものとする。

【0052】

「オフアンレセプター」は、そのレセプターに特異的なリガンドが、同定されていないかまたは未知である内因性レセプターを意味するものとする。

【0053】

「薬学的組成物」は、少なくとも1つの活性成分を含む組成物であって、それによって、この組成物が、哺乳動物(例えば、限定ではなく、ヒト)における、指定された有効な結果についての調査に従う組成物を意味するものとする。当業者は、活性成分が、当業者の必要性に基づいて、所望の効力のある結果を有するか否かを決定するために適切な技術を理解し、そして認識する。

20

【0054】

「プラスミド」は、ベクターとcDNAとの組み合わせを意味するものとする。一般に、プラスミドは、cDNAの複製および/またはタンパク質としての発現の目的のために宿主細胞へと導入される。

【0055】

「セカンドメッセンジャー」は、レセプター活性化の結果として生成される細胞内応答を意味するものとする。セカンドメッセンジャーは、例えば、イノシトール三リン酸(IP₃)、ジアシルグリセロール(diacylglycerol)(DAG)、サイクリックAMP(cAMP)およびサイクリックGMP(cGMP)を含み得る。セカンドメッセンジャーの応答は、レセプター活性化の決定のために測定され得る。さらに、セカンドメッセンジャーの応答は、例えば、逆のアゴニスト、アゴニストおよびアンタゴニストを含む、候補化合物の直接同定のために測定され得る。

30

【0056】

「シグナル対ノイズ比」は、活性化、増幅または刺激に応じて生じたシグナルであって、ここで、このシグナルは、バックグラウンドノイズまたは非活性化、非増幅もしくは非刺激に応じた基底レベルよりも高い、シグナルを意味するものとする。

40

【0057】

「スパーサー」は、遺伝子(例えば、目的のGPCR)の最後のコドンまたは最後のアミノ酸の後に位置するが、目的のGタンパク質の開始コドンまたは開始領域の前に位置する、翻訳された多数のアミノ酸であって、ここで、翻訳された多数のアミノ酸は、目的のGタンパク質の開始領域とインフレームで配置される、翻訳された多数のアミノ酸を意味するものとする。翻訳されたアミノ酸の数は、当業者の必要性に従って調整され得、そして一般に、約1アミノ酸、好ましくは2アミノ酸、より好ましくは3アミノ酸、より好ましくは4アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、より好ましくは6アミノ酸、より好ましくは7アミノ酸、より好ましくは8アミノ酸、より好ましくは9アミノ酸、より好ましくは

50

10 アミノ酸、より好ましくは11アミノ酸、そしてさらにより好ましくは12アミノ酸からである。

【0058】

用語「応答」との関係において、「刺激する」または「刺激している」は、応答が、化合物の非存在下では逆に、化合物の存在下で増大することを意味するものとする。

【0059】

「実質的に」は、コントロールの結果の40%以内、好ましくはコントロールの結果の35%以内、より好ましくは30%以内、より好ましくは25%以内、より好ましくは20%以内、より好ましくは15%以内、より好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内、より好ましくは2%以内、そして最も好ましくは1%以内である結果をいうものとする。例えば、レセプター機能性に関しては、本明細書中に教示される方法または当業者に公知の類似の方法を用いて測定した場合に、伝達されるシグナルが、コントロールのシグナルによって生成されるシグナルの40%以内であるならば、試験レセプターは、コントロールレセプターと実質的に類似の結果を示し得る。

10

【0060】

cDNAに関してベクターは、少なくとも1つのcDNAを組み込み得、かつ宿主細胞へ組み込み得る、環状DNAを意味するものとする。

【0061】

以下の節の順番を、表示効率のために示し、以下の開示についても特許請求の範囲についても、限定であることを意図せず、かつ、そのように解釈すべきではない。

20

【0062】

(A. 序論)

レセプターの伝統的研究は代表的に、発見が進行して、このレセプターに影響を与え得るアンタゴニストおよび他の分子を見出し得る前に最初に、内因性リガンドが同定されなければならないという、(歴史的に基づく)事前の仮定から進行した。アンタゴニストが最初に知られ得た場合でさえ、この探索は直ちに、内因性リガンドを探すことに広げられた。この思考形態は、構成的に活性化されたレセプターが見出された後でさえ、レセプター調査において持続した。これまで認識されてこなかったのは、このレセプターのアゴニストおよび逆のアゴニストを見出すために最も有用なのは、活性状態のレセプターであるということである。過度に活性なレセプターまたは活性が低すぎる(under-active)レセプターからもたらされる疾患に関しては、治療薬物において所望されるのは、内因性リガンドに対するアンタゴニストである薬物では必ずしも無い、それぞれ、レセプターの活性状態を低下させるように作用するかまたはレセプターの活性を増強するように作用する化合物である。これは、活性なレセプター状態の活性を低減または増強する化合物が、内因性リガンドと同じ部位に結合する必要は無いことによる。従って、本発明の方法によって教示されるように、治療化合物についての任意の探索は、リガンド非依存性の活性状態を排除するように化合物をスクリーニングすることによって開始されるべきである。

30

【0063】

(B. ヒトGPCRの同定)

40

ヒトゲノムプロジェクトの努力によって、ヒトゲノム内に位置する核酸配列に関する過度の情報が同定された；この努力における事実は、任意の特定のゲノム配列が、ヒトタンパク質を翻訳するオープンリーディングフレーム情報を含むかもしくは含み得るかまたはそうでないかについて理解することも認識することもなく、遺伝子供配列情報が利用可能になったということである。ヒトゲノム内の核酸配列を同定するいくつかの方法は、当業者の範囲内である。例えば、そして限定ではないが、本明細書中に開示された種々のヒトGPCRを、GenBankTMデータベースを検討することによって見出した。以下の表Bは、本発明者らが見出したいくつかの内因性GPCRを、開示されたGPCRに相同である他のGPCRと一緒に列挙する。

【0064】

50

【表 2】

表 B

開示された ヒト オーファンGPCR	同定された 登録番号	オープン リーディング フレーム (塩基対)	相同 GPCR への参照	命名された GPCRに対する 相同性パーセ ント
hRUP28	AC073957	1,002bp	hGPR30	34%
hRUP29	AC083865	918bp	hGPR18	27%
hRUP30	AC055863	1,125bp	hBRB1	27%
hRUP31	AL356214	1,086bp	hGALR-1	31%
hRUP32	AL513524	1,038bp	hPNR	43%
hRUP33	AL513524	1,020bp	GPR57 GPR58	50% 51%
hRUP34	AL513524	1,029bp	hPNR	45%
hRUP35	AC021089	1,062bp	hκ-3型 オピオイド	27%
hRUP36	AC090099	969bp	GPR90	42%
hRUP37	AC090099	969bp	hMRG	41%

10

20

【0065】

レセプター相同性は、ヒトの身体内でのこのレセプターの役割の正しい認識の獲得に関して有用である。特許文献が進むにつれて、これらのレセプターを変異させて、これらのレセプターの非内因性の構成的活性化バージョンを確立するための技術が考察される。

【0066】

本明細書中に開示された技術はまた、当業者に明らかなように、当該分野で公知の他のヒトGPCRに適用可能である。

30

【0067】

(C. レセプタースクリーニング)

本明細書中に開示されたGPCRの非内因性の構成的活性化バージョンを排除した、候補化合物のスクリーニングは、レセプターの内因性リガンドの使用を必要とすることなく、細胞表面レセプターに作用する候補化合物の直接同定を可能にする。慣用的な、そしてしばしば商業的に利用される技術を用いて、本明細書中に開示されたヒトGPCRの内因性バージョンが発現および/または過剰発現する身体内領域を決定し得る。特定の組織におけるレセプターの発現位置によって、このレセプターの生理学的機能的役割を割り当てる能力が科学者に提供される。これらの技術を用いて、このレセプターの発現および/または過剰発現に関連した、関連の疾患/障害状態を決定することもまた可能である；このよ

40

【0068】

本明細書中に開示されるGPCRの構成的活性化は、GPCRのTM6内に位置すると予測されるプロリン残基からの距離に基づく；このアルゴリズム技術は、同時係属中でかつ同一人に譲渡された特許文書PCT出願第PCT/US99/23938号(WO 00/22129として2000年4月20日に公開)(本明細書中に列挙される他の特許文書とともに、本明細書中に参考として援用される)に開示される。アルゴリズム技術は、伝統的な配列「アラインメント」に基づいては予測されておらず、むしろ、上記のTM6プロリン残基(またはもちろん、このようなプロリン残基についての内因性の構成的置換

50

）からの特定の距離について予測されている。この残基（おそらく、このレセプターの I C 3 領域に存在する）から 16 アミノ酸残基の位置に存在するアミノ酸残基を最も好ましくはリジン残基に変異させることによって、このレセプターの構成的活性化が得られ得る。他のアミノ酸残基は、この目的を達成するために、この位置での変異において有用であり得、そして以下で詳細に考察される。

【0069】

（D．疾患／障害の同定および／または選択）

以下でずっと詳細に示すように、非内因性の構成的に活性化された G P C R に対する逆のアゴニストおよびアゴニストは、本発明の方法論によって同定され得る。このような逆のアゴニストおよびアゴニストは、このレセプターに関連する疾患を処置するための薬物発見プログラムにおけるリード化合物として理想的な候補である。G P C R に対する逆のアゴニストを直接的に同定し、それによって薬学的組成物の開発を可能にする能力があるので、G P C R に関連した疾患および障害についての探索は適切である。特定の組織におけるレセプターの発現位置によって、レセプターに対する生理学的機能を割り当てる能力が科学者に提供される。例えば、罹病組織サンプルおよび正常組織サンプルの両方を、G P C R の存在について走査することは今や、学問的課題または特定の G P C R に対する内因性リガンドを同定する経路に伴って遂行され得るもの以上のものとなる。組織走査は、広範囲の健常組織および罹病組織にわたって実施され得る。このような組織走査は、特定のレセプターを疾患および／または障害と関連付ける際の潜在的な第一工程を提供する。さらに、罹病器官におけるレセプターの発現は、このレセプターの臨床的関連性の大きさを決定する際に同定することを補助し得る。

10

20

【0070】

G P C R の D N A 配列を用いて、プローブ／プライマーを作製し得る。いくつかの好ましい実施形態では、この D N A 配列を用いて、以下のためのプローブを作製する：（a）組織 m R N A に対するドット・プロット分析、および／または（b）組織サンプルにおけるこのレセプターの発現の R T - P C R 同定。組織供給源もしくは罹病組織におけるレセプターの存在、または罹病した組織における、正常組織と比較して上昇した濃度でのこのレセプターの存在を用いて、位置を機能に対して相関させ得、そしてレセプターの生理学的役割／機能を示し得、そしてその機能／役割に関連した疾患を含むがこれらに限定されない処置レジメンを生成し得る。レセプターはまた、この技術によって、器官の領域に局在され得る。レセプターが局在させられる特定の組織の既知または推定の役割／機能に基づいて、このレセプターの推定の生理学的機能が推測され得る。例えば、そして限定ではないが、視床の領域において位置および／または発現するタンパク質は、感覚運動処理および覚醒に関連する（Goodman および Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, 465頁（1996）を参照のこと）。海馬または Schwann 細胞において発現されたタンパク質は、それぞれ、学習および記憶、ならびに末梢神経の髄鞘形成に関連する（それぞれ、Kandel, E. ら, Essentials of Neural Science and Behavior, 657頁、680頁および28頁（1995））。

30

【0071】

（E．候補化合物のスクリーニング）

（1．包括的 G P C R スクリーニングアッセイ技術）

G タンパク質レセプターが構成的に活性になる場合、これは、G タンパク質（例えば、G_q、G_s、G_i、G_z、G_o）に結合し、そして G タンパク質に対する G T P の結合を刺激する。次いで、この G タンパク質は、G T P a s e として作用し、そして G T P を G D P へと加水分解し、それによって、このレセプターは、正常条件下で、不活化されることとなる。しかし、構成的に活性化されたレセプターは、G D P を G T P へと交換し続ける。G T P の加水分解可能でないアナログ [³⁵S] G T P S を用いて、構成的に活性化されたレセプターを発現する膜に対する増強された結合をモニタリングし得る。[³⁵S] G T P S を用いて、リガンドの非存在下および存在下での膜に対する G タンパク質カ

40

50

ップリングをモニタリングし得ることが報告されている。このモニタリングの一例は、当業者に周知および利用可能な他の例の中でも、TraynorおよびNahorskiによって1995年に報告された。このアッセイ系の使用は代表的に、候補化合物の最初のスクリーニングのためである。なぜなら、この系は包括的に、このレセプターの細胞内ドメインと相互作用する特定のGタンパク質にかかわらず、全てのGタンパク質共役レセプターに適用可能である。

【0072】

(2. 特異的GPCRスクリーニングアッセイ技術)

「包括的」Gタンパク質共役レセプターアッセイ(すなわち、アゴニストまたは逆のアゴニストである化合物を選択するためのアッセイ)を用いて候補化合物が一旦同定されたら、この化合物がレセプター部位で相互作用したことを確認するさらなるスクリーニングが好ましい。例えば、「包括的」アッセイによって同定される化合物は、レセプターに結合しないかもしれないが、その代わりに、Gタンパク質を細胞内ドメインから単に「脱共役」し得る。

10

【0073】

(a. G_s 、 G_z および G_i)

G_s は、酵素アデニリルシクラーゼを刺激する。一方、 G_i (ならびに G_z および G_o) は、アデニリルシクラーゼを阻害する。アデニリルシクラーゼは、cAMPへのATPの変換を触媒する；従って、 G_s タンパク質を共役する、構成的に活性化されたGPCRは、上昇した細胞レベルのcAMPに関連する。一方、 G_i (または G_z 、 G_o) タンパク質を共役する、構成的に活性化されたGPCRは、低下した細胞レベルのcAMPに関連する。一般的に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」, 第8章, From Neuron To Brain (第3版) Nichols, J. G. ら編, Sinauer Associates, Inc. (1992)を参照のこと。従って、cAMPを検出するアッセイを利用して、候補化合物が、例えば、そのレセプターに対する逆のアゴニストである(すなわち、このような化合物は、cAMPのレベルを減少させる)か否かを決定し得る。cAMPを測定するための、当該分野で公知の種々のアプローチが利用され得る；最も好ましいアプローチは、ELISAベースの形式における抗cAMP抗体の使用に頼る。利用され得る別の型のアッセイは、細胞全体のセカンドメッセンジャーレポーター系アッセイである。遺伝子上のプロモーターは、特定の遺伝子がコードするタンパク質の発現を駆動する。サイクリックAMPは、cAMP応答性DNA結合タンパク質または転写因子(CREB)の結合を促進することによって遺伝子発現を駆動し、CREBは次いで、特定の部位(cAMP応答性エレメント)でプロモーターに結合し、そして遺伝子の発現を駆動する。プロモーターを有するレポーター系であって、このプロモーターが、レポーター遺伝子(例えば、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ)の前に複数のcAMP応答エレメントを含むレポーター系が構築され得る。従って、構成的に活性化された G_s 連結レセプターは、cAMP蓄積を引き起こし、このことは次いで、この遺伝子を活性化して、このレポータータンパク質の発現を導く。次いで、レポータータンパク質(例えば、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ)は、標準的生化学アッセイ(Chenら 1995)を用いて検出され得る。

20

30

40

【0074】

(b. G_q および G_o)

G_q および G_o は、酵素ホスホリパーゼCの活性化に関連し、これは次いで、リン脂質PIP₂を加水分解して、以下の2つの細胞内メッセンジャーを放出する：ジアシルグリセロール(diacylglycerol)(DAG)およびイノシトール1,4,5-三リン酸(inositol 1,4,5-triphosphate)(IP₃)。IP₃の増大した蓄積は、 G_q 関連レセプターおよび G_o 関連レセプターの活性化と関連する。一般的に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」, 第8章, From Neuron To Brain

50

(第3版)Nichols, J. G.ら編、Sinauer Associates, Inc. (1992)。IP₃蓄積を検出するアッセイを利用して、候補化合物が、例えば、G_q関連レセプターまたはG_o関連レセプターに対する逆のアゴニストである(すなわち、このような化合物は、IP₃のレベルを低下させる)か否かを決定し得る。G_q関連レセプターをまた、AP1レポーターアッセイを用いて試験し得、ここで、G_q依存的ホスホリパーゼCは、AP1エレメントを含む遺伝子の活性化を引き起こす;従って、活性化されたG_q関連レセプターは、このような遺伝子の発現における増大を立証し、それによって、それに対する逆のアゴニストは、このような発現における減少を立証し、そしてアゴニストはこのような発現における増大を立証する。このような検出のための市販のアッセイが利用可能である。

10

【0075】

(3. GPCR融合タンパク質)

逆のアゴニストの直接同定のための候補化合物のスクリーニングにおいて使用するための、内因性の構成的に活性化されたGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRの使用において、明らかに、レセプターが、それに結合する内因性リガンドの非存在下でさえ、活性であるという点で、アゴニストは、興味深いスクリーニングチャレンジを提供する。従って、例えば、候補化合物の存在下の非内因性レセプターと、その化合物の非存在下での非内因性レセプターとの識別のような識別によって、このような化合物が逆のアゴニストもしくはアゴニストであり得る、またはこのようなレセプターに対して何の効果も有さないかについての理解を可能にすることを目的として、候補化合物の存在下の非内因性レセプターと、その化合物の非存在下での非内因性レセプターとを識別するために、このような識別を増強し得るアプローチを利用することが好ましい。好ましいアプローチは、GPCR融合タンパク質の使用である。

20

【0076】

一般に、上記のアッセイ技術(ならびに他の技術)を用いて、非内因性GPCRが構成的に活性化されていることが一旦決定されたら、内因性GPCRと共役する優勢なGタンパク質を決定することが可能である。GPCRに対するGタンパク質の共役は、評価され得るシグナル伝達経路を提供する。いくつかの実施形態では、哺乳動物発現系を用いてスクリーニングを行うことが好ましく、このような系は、その中に内因性Gタンパク質を有すると予測される。従って、明らかに、このような系では、非内因性の構成的に活性化されたGPCRは、連続してシグナルを発する。いくつかの実施形態では、このシグナルが増強され、その結果、例えば、レセプターに対する逆のアゴニストの非存在下では、逆のアゴニストと接触した場合のこのレセプターとの間を(特に、スクリーニングの状況において)より容易に識別し得る可能性がより高いことが好ましい。

30

【0077】

GPCR融合タンパク質は、非内因性GPCRとのGタンパク質共役の効力を増強することが意図される。GPCR融合タンパク質は、内因性の構成的に活性化されたGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRのいずれかを用いたスクリーニングのために好ましい。なぜなら、このようなアプローチは、このようなスクリーニング技術において利用されるシグナルを増大させるからである。これは、顕著な「シグナル対ノイズ」比を容易にする際に重要である;このような顕著な比は、本明細書中に開示されたような候補化合物のスクリーニングのために好ましい。

40

【0078】

GPCR融合タンパク質の発現のために有用な構築物の構築は、当業者の範囲内にある。市販の発現ベクターおよび系は、調査者の特定の必要性に適合し得る種々のアプローチを提供する。このようなGPCR融合タンパク質構築物の構築についての重要な基準としては、内因性GPCR配列およびGタンパク質配列が両方ともインフレームであること(好ましくは、内因性GPCRについての配列がGタンパク質配列の上流にある)、およびGPCRの発現の際にこのGタンパク質もまた発現され得るように、GPCRの「停止」コドンが欠失または置換されていることが挙げられるがこれらに限定されない。他の実施形

50

態としては、内因性 GPCR 配列および G タンパク質配列がインフレームでなく、そして / または「停止」コドンが欠失も置換もされていない構築物が挙げられる。GPCR は、G タンパク質に対して直接的に連結され得るか、または 2 つ（好ましくは約 12 以下だがこの数は当業者によって容易に確認され得る）の間にスペーサー残基が存在し得る。便宜性に基づいて、スペーサーを使用することが好ましい。好ましくは、非内因性 GPCR に共役する G タンパク質は、GPCR 融合タンパク質構築物の作製の前に同定されている。G タンパク質はほんのいくつかしか同定されていないので、G タンパク質の配列を含む構築物（すなわち、ユニバーサル G タンパク質構築物（実施例を参照のこと））が、その中への内因性 GPCR 配列の挿入のために利用可能であることが好ましい；このことは、異なる配列を有する種々の異なる内因性 GPCR の大規模スクリーニングの状況においてさらなる効率を提供する。

【0079】

上記のように、 G_i 、 G_z および G_o に共役する、構成的に活性化された GPCR は、cAMP の形成を阻害すると予測され、このことは、これらの型の GPCR に基づくアッセイを困難なものとする（すなわち、cAMP シグナルは、活性化されると減少し、それゆえ、例えば、逆のアゴニスト（これはさらにこのシグナルを減少させる）の直接同定を困難なものとする）。本明細書中に開示されるように、本発明者らは、これらの型のレセプターについて、実行可能なシクラーゼベースのアッセイを確立する努力において、GPCR 内因性 G タンパク質に基づかない GPCR 融合タンパク質を作製することが可能であることを確認した。従って、例えば、内因性 G_i 共役レセプターは、 G_s タンパク質へと融合され得る - このような融合構築物は、発現の際に、内因性 GPCR を「天然の」 G_i タンパク質ではなく、例えば、 G_s と共役するように「駆動」または「強要」し、その結果、シクラーゼベースのアッセイが確立され得る。従って、 G_i 共役レセプター、 G_z 共役レセプターおよび G_o 共役レセプターは、いくつかの実施形態では、GPCR 融合タンパク質が用いられ、そしてアッセイがアデニリルシクラーゼ活性の検出に基づく場合、融合構築物が、 G_s （または酵素アデニリルシクラーゼの形成を刺激する等価な G タンパク質）を用いて確立されることが好ましい。

【0080】

【表 3】

G タンパク質	GPCR の活性化 (すなわち、構成的 活性化または アゴニスト結合) の際の cAMP の影響	GPCR の活性化 (すなわち、構成的 活性化または アゴニスト結合) の際の IP_3 蓄積の影響	逆のアゴニスト との接触の際の cAMP 産生の 影響	逆のアゴニスト との接触の際の IP_3 蓄積の 影響
G_s	増加する	N/A	減少する	N/A
G_i	減少する	N/A	増加する	N/A
G_z	減少する	N/A	増加する	N/A
G_o	減少する	増加する	増加する	減少する
G_q	N/A	増加する	N/A	減少する

【0081】

同等に有効であるのは、 G_s タンパク質、 G_i タンパク質、 G_z タンパク質または G_o タンパク質と融合した G_q タンパク質を利用する G タンパク質融合構築物である。いくつかの実施形態では、好ましい融合構築物は、 G_q タンパク質を用いて達成され得、ここで、

Gタンパク質 - サブユニット (「G_q」) の最初の 6 個のアミノ酸は欠失しており、そして G_{aq} の C 末端の最後の 5 個のアミノ酸は、目的の Gタンパク質の G の対応するアミノ酸で置換されている。例えば、融合構築物は、G_i タンパク質と融合した G_q (6 個のアミノ酸欠失) を有し得、「G_q / G_i 融合構築物」をもたらす。この融合構築物は、内因性 G_i 共役レセプターがその非内因性 Gタンパク質 G_q に対して共役するように強要し、その結果、セカンドメッセンジャー (例えば、イノシトール三リン酸またはジアシルグリセロール) が、cAMP 生成の代わりに測定され得る。

【0082】

(4. 標的 G_i 共役 GPCR とシグナルエンハンサー G_s 共役 GPCR との同時トランスフェクション (cAMP ベースのアッセイ))

G_i 共役レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害することが公知であり、それゆえ、cAMP 生成のレベルを低下させ、このことは、cAMP レベルの評価を困難にし得る。活性化されると G_i と優先的に共役するレセプターの構成的活性化の指標として、cAMP の生成における減少を測定する際の 1 つの有効な技術は、シグナルエンハンサー (例えば、活性化されると G_s と優先的に共役する非内因性の構成的に活性化されたレセプター) (例えば、以下に開示される TSHR - A623I) を G_i 連結 GPCR と同時トランスフェクトすることによって達成され得る。明らかであるように、G_s 共役レセプターの構成的活性化は、cAMP の生成における増加に基づいて決定され得る。G_i 共役レセプターの構成的活性化は、cAMP 生成における減少を導く。従って、同時トランスフェクションアプローチは、これらの「逆の」効果 (affect) を有利に利用することが意図される。例えば、非内因性の構成的に活性化された G_s 共役レセプター (「シグナルエンハンサー」) と内因性 G_i 共役レセプター (「標的レセプター」) との同時トランスフェクションは、ベースラインの cAMP シグナルを提供する (すなわち、G_i 共役レセプターは cAMP レベルを低下させるが、この「低下」は、構成的に活性化された G_s 共役シグナルエンハンサーによって確立される、cAMP レベルにおける実質的上昇と比較してである)。次いで、このシグナルエンハンサーを、構成的活性化バージョンの標的レセプターと同時トランスフェクトすることによって、cAMP は、G_i 標的の上昇した機能的活性 (すなわち、これは、cAMP を減少させる) に起因して、(ベースラインと比較して) さらに減少すると予想される。

【0083】

次いで、cAMP ベースのアッセイを用いた候補化合物のスクリーニングは、内因性レセプター / Gタンパク質融合物の使用と比較した 2 つの「変化」を用いて達成され得る：第一に、G_i 共役標的レセプターと比較して、「逆の」効果がもたらされる (すなわち、G_i 共役標的レセプターの逆のアゴニストは、測定される cAMP シグナルを増加させ、一方、G_i 共役標的レセプターのアゴニストは、このシグナルを減少させる；第二に、明らかのように、このアプローチを用いて直接的に同定される候補化合物は、独立して評価されて、これらがシグナル増強レセプターを標的としないことを確実にするべきである (これは、同時トランスフェクトされたレセプターに対するスクリーニングの前または後に行われ得る)。

【0084】

(F. 医薬品化学)

一般に、しかし常にではなく、候補化合物の直接同定は、コンビナトリアルケミストリー技術を介して生成される化合物に関連して行われ、それによって、数千の化合物が、このような分析のためにランダムに調製される。一般に、このようなスクリーニングの結果は、独特のコア構造を有する化合物である；その後、これらの化合物は、好ましいコア構造の周囲のさらなる化学修飾に供されて、その医学的特性がさらに増強され得る。このような技術は、当業者に公知であり、そして本特許文書において詳細に取り扱われない。

【0085】

(G. 薬学的組成物)

さらなる開発のために選択された候補化合物は、当業者に周知の技術を用いて薬学的組成

10

20

30

40

50

物中に処方され得る。適切な、薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に利用可能である；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 1980, Mack Publishing Co. (Osola編)を参照のこと。

【0086】

(H. 他の有用性)

本明細書中に開示された非内因性バージョンのGPCRの好ましい使用は、(好ましくは薬学的薬剤としての使用のための)逆のアゴニストまたはアゴニストとしての候補化合物の直接同定のためであり得るが、これらのバージョンのGPCRの他の用途が存在する。例えば、GPCRを取り込んだインビトロおよびインビボでの系を利用して、これらのレセプターが、ヒトの(正常および罹病の両方の)状態において果たす役割をさらに解明および理解し得、そしてシグナル伝達カスケードを理解するためにこれを適用する場合、構成的活性化の役割を理解し得る。いくつかの実施形態では、内因性レセプターが「オープンレセプター」、すなわち、レセプターに対する内因性リガンドが同定されていないことが好ましい。それゆえ、いくつかの実施形態では、それゆえ、内因性リガンドが同定される前に、改変された非内因性GPCRを用いて、ヒトの身体における内因性レセプターの役割を理解し得る。このようなレセプターをまた用いて、既知のレセプターおよびそれらがシグナルを伝達する経路をさらに解明し得る。開示されたレセプターの他の用途は、とりわけ、本特許文書の概説に基づいて当業者に明らかになる。

10

【0087】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の解明の目的で提示され、限定の目的で提示されるわけではない。特定の核酸配列およびアミノ酸配列が本明細書中に開示されているが、当業者は、以下に報告されるのと同じまたは実質的に類似の結果を達成しながらも、これらの配列に対するマイナーな改変を行う能力があると考えられる。ある配列由来の配列カセットの、別の配列由来の配列カセットへの(例えば、ラットレセプターからヒトレセプターへの、またはヒトレセプターAからヒトレセプターBへの)適用または理解のための伝統的アプローチは一般的に、配列アラインメント技術に対して推定され、それによって、配列は、共通性のある領域を決定するための努力においてアラインメントされる。本明細書中に開示された変異アプローチは、このアプローチに頼らないが、その代わりにアルゴリズムアプローチおよびヒトGPCRのTM6領域内に位置する保存されたプロリン残基からの位置的距離に基づく。一旦このアプローチが確実にされたら、当業者は、それに対するマイナーな改変を行って、本明細書中に開示されたのと同質的に同じ結果(すなわち、構成的活性化)を達成する能力があると考えられる。このような改変版のアプローチは、本開示の範囲内にあると考えられる。

20

30

【0088】

(実施例1：内因性ヒトGPCRS)

(1. ヒトGPCRの同定)

開示された内因性ヒトGPCRを、GenBankTMデータベース情報の概要に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、以下のcDNAクローンを、以下(表C

40

【0089】

【表4】

表 C

開示された ヒト オーファン GPCR	同定された 登録番号	オープン リーディング フレーム (塩基対)	相同GPCR への参照	核酸の 配列番号	アミノ酸の 配列番号
hRUP28	AC073957	1,002bp	hGPR30	1	2
hRUP29	AC083865	918bp	hGPR18	3	4
hRUP30	AC055863	1,125bp	hBRB1	5	6
hRUP31	AL356214	1,086bp	hGALR-1	7	8
hRUP32	AL513524	1,038bp	hPNR	9	10
hRUP33	AL513524	1,020bp	GPR57 GPR58	11	12
hRUP34	AL513524	1,029bp	hPNR	13	14
hRUP35	AC021089	1,062bp	hκ-3型 オピオイド	15	16
hRUP36	AC090099	969bp	GPR90	17	18
hRUP37	AC090099	969bp	hMRG	19	20

10

20

【0090】

(2. 全長クローニング)

(a. hRUP28 (配列番号1および2))

開示されたヒトRUP28を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AC073957のcDNAクローンを、第7染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0091】

全長RUP28を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒト成人肝臓Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech)を用いるPCRによってクローニングした：

30

5'-CAGAGCTCTGTGGTGGCCACCTCTGTCC-3' (配列番号21；センス、開始コドンの5'側)、5'-CTGCGTCCACCAGAGTCACTCTCC-3' (配列番号22；アンチセンス、停止コドンの3'側)。AdvantageTM cDNAポリメラーゼ (Clontech) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる、50μl反応における増幅のために用いた：95℃で5分間；94℃で30秒間；58℃で30秒間；72℃で1分30秒間；および72℃で7分間。

【0092】

1.16kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号1を、そして推定アミノ酸配列については配列番号2を参照のこと。

40

【0093】

(b. hRUP29 (配列番号3および4))

開示されたヒトRUP29を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AC0083865のcDNAクローンを、第7染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0094】

全長RUP29を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNAを用

50

いるPCRによってクローニングした：

【0095】

【化1】

5'-GTATGCCTGGCCACAATACCTCCAGG-3' (配列番号23; センス, 開始コドンを含む),

5'-GTTTGTGGCTAACGGCACAAAACACAATTCC-3' (配列番号24; アンチセンス, 停止コドンを含む)。

【0096】

TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによって、50μl 反応における増幅のために用いた：94 で5分間；94 で30秒間；54 で30秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。 10

【0097】

930bpのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。

【0098】

cDNA末端の迅速増幅 (RACE) を、ヒト白血球および卵巣の Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いて行って、RUP29 cDNAの正確な5'末端を決定した。RUP29特異的プライマー (1) (配列：5'-GGTAC CACAATGACAATCACCCAGCGTCC-3' (配列番号25) を有する) およびAP1プライマー (Clontech) を、1回目のPCR反応のために用い、そしてRUP29特異的プライマー (2) (以下の配列を有する：5'-GGAACGTGAGGTACATGTGTGGATGTGTCAGC-3' (配列番号26)) およびAP2プライマー (Clontech) を、2回目のPCR反応のために用いた。RACE反応の産物を単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そして配列決定した。核酸配列については配列番号3を、そして推定アミノ酸配列については配列番号4を参照のこと。 20

【0099】

(c.hRUP30 (配列番号5および6))

開示されたヒトRUP30を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AC055863のcDNAクローンを、第17染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。 30

【0100】

全長RUP30を、テンプレートとしてのヒト脾臓 Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いる5' RACE-PCRによってクローニングし、そして以下のオリゴヌクレオチド：5'-GCAGTGTAGCGGTCAACCGTGAAGCAGG-3' (配列番号27; センス, 開始コドンを含む)、およびAP1プライマー (Clontech) を1回目のRT-PCRのために用い、そしてオリゴヌクレオチド：5'-TGAGCAGGATGGCGATCCAGACTGAGGCGTGG-3' (配列番号28; アンチセンス, 停止コドンを含む) およびAP2プライマー (Clontech) を2回目のPCRのために用いた。5' RACE-PCRによって作製されたDNAフラグメントをpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてSP6/T7プライマー (Stratagene) を用いて配列決定した。 40

【0101】

5' RACE産物の配列に基づいて、全長RUP30を、以下のプライマーならびにテンプレートとしてのヒト脾臓 Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いてRT-PCRによってクローニングした： 50

【0102】

【化2】

5'-GAGGTACAGCTGGCGATGCTGACAG-3' (配列番号29;センス,開始コドンとしてのATG);

5'-GTGGCCATGAGCCACCCTGAGCTCC-3' (配列番号30;アンチセンス,停止コドンの3'側)。

【0103】

Taq DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる50μlの反応における増幅のために用いた：94 で40秒間；94 で20秒間；64 で20秒間；72 で2分間；および72 で5分間。

【0104】

1.2kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしていくつかのクローンを、ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号5を、そして推定アミノ酸配列については配列番号6を参照のこと。

【0105】

(d.hRUP31 (配列番号7および8))

開示されたヒトRUP31を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AL356214のcDNAクローンを、第10染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0106】

全長RUP31を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒト乳腺 Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いるRT-PCRによってクローニングした：

【0107】

【化3】

5'-GGAATGTCCACTGAATGCGCGCGG-3' (配列番号31;センス,開始コドンを含む),

5'-AGCTCGCCAGGTGTGAGAACTCGG-3' (配列番号32;アンチセンス,停止コドンの3'側)。

【0108】

AdvantageTM cDNAポリメラーゼ (Clontech) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによって、50μl反応における増幅のために用いた：94 で40秒間；94 で20秒間；66 で20秒間；72 で1分30秒間；および72 で5分間。

【0109】

1.1kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号7を、そして推定アミノ酸配列については配列番号8を参照のこと。

【0110】

(e.hRUP32 (配列番号9および10))

開示されたヒトRUP32を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AL513524のcDNAクローンを、第6染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0111】

全長RUP32を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNA (Clontech) を用いるPCRによってクローニングした：

【0112】

【化4】

10

20

30

40

50

5'-GCGTTATGAGCAGCAATTCATCCCTGCTGG-3' (配列番号33;センス,開始コドンを含む),
5'-GTATCCTGAACTTCGTCTATACAACCTGC-3' (配列番号34;アンチセンス)。

【0113】

TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる増幅のために用いた：94 で3分間；94 で20秒間；58 で20秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。

【0114】

1.06のkb PCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号9を、そして推定アミノ酸配列については配列番号10を参照のこと。

【0115】

(f.hRUP33 (配列番号11および12))

開示されたヒトRUP33を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AL513524のcDNAクローンを、第6染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0116】

全長RUP33を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNA (Clontech) を用いるPCRによってクローニングした：

【0117】

【化5】

5'-CCCTCAGGAATGATGCCCTTTTGCCACAA-3' (配列番号35;センス,開始コドンを含む),
5'-ATCCATGTGGTTGGTGCATGTGGTTCGT-3' (配列番号36;アンチセンス)。

【0118】

TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる増幅のために用いた：94 で3分間；94 で20秒間；56 で20秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。

【0119】

1.1kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号11を、そして推定アミノ酸配列については配列番号12を参照のこと。

【0120】

(g.hRUP34 (配列番号13および14))

開示されたヒトRUP34を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AL513524のcDNAクローンを、第6染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0121】

全長RUP34を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNA (Clontech) を用いるPCRによってクローニングした：

【0122】

【化6】

5'-AAACAACAAACAGCAGAACCATGACCAGC-3' (配列番号37;センス,開始コドンを含む),
5'-ACATAGAGACAAGTGACATGTGTGAACCAC-3' (配列番号38;アンチセンス)。

【0123】

TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2～工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる増幅のために用いた：94 で3分間；94 で20秒間；60 で20秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。

【0124】

1.27 kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号13を、そして推定アミノ酸配列については配列番号14を参照のこと。

【0125】

(h.hRUP35 (配列番号15および16))

開示されたヒトRUP35を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AC021089のcDNAクローンを、第16染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0126】

RUP35の5'配列を、テンプレートとしてヒト胎児脳 Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いた5' RACE-PCRによって決定した。オリゴヌクレオチド5'-GGTATGAGACCGTGTTGGTACTTGAGC-3' (配列番号39;センス) およびAP1プライマー (Clontech) を1回目のRT-PCRのために用い、そしてオリゴヌクレオチド5'-GTGGCAGACAGCGATATACCTGTCAATGG-3' (配列番号40;アンチセンス) およびAP2プライマー (Clontech) を2回目のPCRのために用いた。5' RACE-PCRによって生成されたDNAフラグメントをpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてSP6/T7プライマー (Stratagene) を用いて配列決定した。

【0127】

5' RACE産物の配列に基づいて、全長RUP35を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒト脳 Marathon-ReadyTM cDNA (Clontech) を用いるRT-PCRによってクローニングした：

【0128】

【化7】

5'-GCGCTCATGGAGCACACGCACGCCAC-3' (配列番号41;センス,開始コドンとしてのATG) および

5'-GAGGCAGTAGTTGCCACACCTATGG-3' (配列番号42;アンチセンス,停止コドンの3'側)。

【0129】

AdvantageTM cDNAポリメラーゼ (Clontech) を、工程2～工程4を45回繰り返す以下のサイクルによる100 μlの反応における増幅のために用いた：95 で2分間；95 で20秒間；60 で20秒間；72 で1分30秒間；および72 で5分間。

【0130】

1.0 kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配

列決定した。核酸配列については配列番号 15 を、そして推定アミノ酸配列については配列番号 16 を参照のこと。

【0131】

(i. hRUP36 (配列番号 17 および 18))

開示されたヒトRUP36を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。このデータベースを検索する間に、登録番号AC090099のcDNAクローンを、第11染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0132】

全長RUP36を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNA (Clontech) を用いるPCRによってクローニングした：

5' - CATCTGGTTTGTGTTCCCAAGGGGCACCAAG - 3' (配列番号 43 ; センス、開始コドンの5'側)、

5' - GACAGTGTGTGCTCTCAAAAGTCCCGTCTGACTG - 3' (配列番号 44 ; アンチセンス、停止コドンの3'側)。TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2 ~ 工程4を30回繰り返す以下のサイクルによる50μlの反応における増幅のために用いた：95 で5分間；95 で30秒間；70 で30秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。

【0133】

1.0kbのPCRフラグメントを1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号 17 を、そして推定アミノ酸配列については配列番号 18 を参照のこと。

【0134】

(j. hRUP37 (配列番号 19 および 20))

開示されたヒトRUP37を、GenBankデータベース情報の使用に基づいて同定した。データベースを検索する間に、登録番号AC090099のcDNAクローンを、第11染色体由来のヒトゲノム配列と同定した。

【0135】

全長RUP37を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのヒトゲノムDNA (Clontech) を用いるPCRによってクローニングした：5' - CTGTTTCCAAGGGTCATCAGACTGGG - 3' (配列番号 45 ; センス)；5' - GCAGCAATTGCTCTCAAAAGTCCCTGTCTG - 3' (配列番号 46 ; アンチセンス)。TaqPlus (登録商標) Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、工程2 ~ 工程4を35回繰り返す以下のサイクルによる増幅のために用いた：95 で5分間；95 で30秒間；62 で30秒間；72 で1分30秒間；および72 で7分間。

【0136】

969塩基対を1%アガロースゲルから単離し、そしてpCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、そしてABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号 19 を、そして推定アミノ酸配列については配列番号 20 を参照のこと。

【0137】

(実施例2：非内因性の構成的に活性化されたGPCRの調製)

当業者は、核酸配列の変異のための技術を選択する能力を有すると考えられる。以下に提示されるのは、上記で開示されたヒトGPCRのいくつかの非内因性バージョンを作製するために利用されるアプローチである。以下に開示される変異は、アルゴリズムアプローチに基づき、それによって、保存されたプロリン (またはそれについての内因性の保存的

10

20

30

40

50

置換) 残基 (T M 6 / I C 3 界面付近の G P C R の T M 6 領域に位置する) から 1 6 番目のアミノ酸 (G P C R の I C 3 領域に位置する) を、好ましくはアラニン、ヒスチジン (histidine)、アルギニンまたはリジンのアミノ酸残基、最も好ましくはリジンのアミノ酸残基へと変異させる。

【0138】

(1. Transformer Site-DirectedTM 変異誘発)
非内因性ヒト G P C R の調製は、とりわけ、Transformer Site-DirectedTM Mutagenesis Kit (Clontech) を製造業者の指示に従って用いて、ヒト G P C R において達成され得る。いくつかの実施形態では、2 つの変異誘発プライマー (好ましくは、リジン変異を作製するリジン変異誘発オリゴヌクレオチドおよび選択マーカーオリゴヌクレオチド) が用いられる。便宜のために、ヒト G P C R に組み込まれるべきコドン変異もまた、標準形態で注記される (表 D) :

10

【0139】

【表 5】

表 D

レセプター識別名	コドン変異
hRUP28	V274K
hRUP29	T249K
hRUP30	R232K
hRUP31	M294K
hRUP32	F220K
hRUP34	A238K
hRUP35	Y215K
hRUP36	L294K
hRUP37	T219K

20

【0140】

30

(実施例 3 : レセプター発現)

タンパク質の発現のために当業者に種々の細胞が入手可能であるが、哺乳動物細胞が利用されることが好ましい。この主な理由は、実際的なことに基づいて推定される。すなわち、例えば、G P C R の発現のための酵母細胞の利用は、可能であるが、哺乳動物系について進化したレセプター共役、遺伝的機構および分泌経路を含まないかもしれない (実際、酵母の場合含まない) 非哺乳動物細胞をこのプロトコルに導入し、従って、非哺乳動物細胞において得られる結果は、潜在的用途はあるとはいえ、哺乳動物細胞を用いて得られる結果ほど好ましくはない。哺乳動物細胞のうち、COS-7 細胞、293 細胞および 293 T 細胞は特に好ましいが、利用される特定の哺乳動物細胞は、当業者の特定の必要性に基づいて推定され得る。

40

【0141】

(a. 一過性トランスフェクション)

1 日目に、 6×10^6 細胞 / 10 cm ディッシュの 293 細胞のウェルをプレーティングした。2 日目に、2 つの反応チューブを調製した (各チューブについての以下の比率は、1 プレートあたりである) : チューブ A を、0.5 ml 無血清 DMEM (Gibco BRL) 中の 4 μ g DNA (例えば、pCMV ベクター; レセプター cDNA を有する pCMV ベクターなど) を混合することによって調製した; チューブ B を、0.5 ml 無血清 DMEM 中の 24 μ l のリポフェクトアミン (lipofectamine) (Gibco BRL) を混合することによって調製した。チューブ A および B を、(数回) 反転することによって混合し、続いて室温で 30 分間 ~ 45 分間にわたってインキュベートし

50

た。この混合物を、「トランスフェクション混合物」という。プレーティングした293細胞を1×PBSで洗浄し、続いて5ml無血清DMEMを添加した。1mlのトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて37/5% CO₂で4時間にわたってインキュベートした。トランスフェクション混合物を吸引によって除去し、続いて10mlのDMEM/10% Fetal Bovine Serumを添加した。細胞を37/5% CO₂でインキュベートした。48時間のインキュベーション後、細胞を収集し、そして分析のために利用した。

【0142】

(b. 安定な細胞株)

約12×10⁶個の293細胞を15cm組織培養プレートにプレーティングし、そして10%ウシ胎仔血清および1パーセントのピルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよび抗生物質を含有するDME High Glucose Medium中で増殖させる。293細胞のプレーティングの24時間後(約80%コンフルエンスまで)、細胞を、12μgのDNAを用いてトランスフェクトする。12μgのDNAを、60μlのリボフェクトアミンおよび2mlの無血清DME High Glucose Mediumと合わせる。培地をこのプレートから吸引し、そして細胞を無血清培地で1回洗浄する。DNA、リボフェクトアミンおよび培地混合物を、10mlの無血清培地とともにこのプレートに添加する。4~5時間にわたる37でのインキュベーション後、培地を吸引し、そして25mlの血清含有培地を添加する。トランスフェクションの24時間後、再度培地を吸引し、そして新鮮な血清含有培地を添加する。トランスフェクションの48時間後、培地を吸引し、そしてジェネティシン(G418薬物)を500μg/mlの最終濃度で含有する血清含有培地を添加する。次いで、トランスフェクトした細胞を、G418耐性遺伝子を含む、ポジティブにトランスフェクトされた細胞について選択する。培地を、選択をしながら、4~5日毎に交換する。選択の間、細胞を増殖させて、安定なブールを作製するか、または安定なクローン選択のために分ける。

【0143】

(実施例4: 非内因性GPCRの構成的活性の決定のためのアッセイ)

種々のアプローチが、非内因性ヒトGPCRの構成的活性の評価のために利用可能である。以下は例示である; 当業者は、当業者の要求に優先的に有益である技術を決定する能力を有すると考えられる。

【0144】

(1. 膜結合アッセイ: [³⁵S]GTP Sアッセイ)

Gタンパク質共役レセプターが、リガンド結合または構成的活性化の結果のいずれかとして、その活性な状態にある場合、このレセプターは、Gタンパク質に共役し、そしてGDPの放出およびその後の、Gタンパク質へのGTPの結合を刺激する。Gタンパク質-レセプター複合体のサブユニットはGTPaseとして作用し、そしてGTPをGDPへとゆっくりと加水分解し、この時点で、このレセプターは通常非活性化される。構成的に活性化されたレセプターは、GDPをGTPへと交換し続ける。加水分解可能でないGTPアナログである[³⁵S]GTP Sを利用して、構成的に活性化されたレセプターを発現する膜への[³⁵S]GTP Sの結合の増強を実証し得る。構成的活性化を測定するために[³⁵S]GTP S結合を用いることの利点は、以下を含むがこれらに限定されない: (a) これは、全てのGタンパク質共役レセプターに包括的に適用可能である; (b) これは、膜表面に近位であり、細胞内カスケードに影響を与える分子を拾い上げる可能性を少なくする。

【0145】

このアッセイは、Gタンパク質共役レセプターが、関連するレセプターを発現する膜に対する[³⁵S]GTP S結合を刺激する能力を利用する。それゆえ、このアッセイを直接同定法において用いて、構成的に活性化されたGタンパク質共役レセプターに対する候補化合物をスクリーニングし得る。このアッセイは包括的であり、そして全てのGタンパク質共役レセプターでの薬物の発見に適用される。

【0146】

[³⁵S]GTP Sアッセイを、20mM HEPES、および1mMと約20mMとの間（この量は、結果の最適化のために調整され得るが、20mMが好ましい）のMgCl₂（pH7.4）、約0.3nMと約1.2nMとの間の[³⁵S]GTP S（この量は、結果の最適化のために調整され得るが、1.2が好ましい）を含む結合緩衝液、および12.5μg～75μgの膜タンパク質（例えば、G_s融合タンパク質を発現する293細胞；この量は、最適化のために調整され得る）、および10μM GDP（この量は最適化のために変更され得る）中で1時間にわたってインキュベートする。次いで、コムギ胚芽凝集素ビーズ（25μl；Amersham）を添加し、そして混合物をさらに30分間にわたって室温でインキュベートする。次いで、チューブを1500×gで5分間にわたって室温で遠心分離し、次いで、シンチレーションカウンター中で計数する。 10

【0147】

（2．アデニリルシクラーゼ）

細胞ベースのアッセイのために設計されたFlash PlateTM Adenylyl Cyclaseキット（New England Nuclear；Cat. No. SMP004A）を、粗製原形質膜を用いた使用のために改変し得る。Flash Plateウェルは、cAMPを認識する特異抗体をまた含むシンチラント（scintillant）コーティングを含み得る。ウェル中で生成されたcAMPを、cAMP抗体への放射性cAMPトレーサーの結合についての直接的競合によって定量し得る。以下は、このレセプターを発現する細胞全体におけるcAMPレベルの変化の測定のための簡略な 20
プロトコルとして役立つ。

【0148】

トランスフェクトされた細胞を、一過性トランスフェクションの約24時間後に収集する。培地を注意深く吸引して捨てる。10mlのPBSを、細胞の各ディッシュに穏やかに添加し、続いて注意深く吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを各プレートに添加する。細胞をピペットでプレートから取り出し、そして細胞懸濁液を50mlの円錐形遠心管に収集する。細胞を室温で、1,100rpmで5分間遠心分離する。細胞ペレットを適切な容量のPBS（約3ml/プレート）中に注意深く再懸濁する。次いで、細胞を、血球計算板を用いて計数し、そしてさらなるPBSを添加して、（約50μl/ウェルの最終容量になるように）適切な数の細胞を得る。 30

【0149】

cAMP標準およびDetection Buffer（11mlのDetection Bufferに対して1μCiのトレーサー[¹²⁵I cAMP（50μl）を含む）を、製造業者の指示に従って調製し、そして維持する。Assay Bufferを、スクリーニングのために新たに調製し、そしてこれは、50μlのStimulation Buffer、3μlの試験化合物（12μMの最終アッセイ濃度）および50μlの細胞を含む。Assay Bufferを、利用するまで氷上で保存する。このアッセイを、適切なウェルへの50μlのcAMP標準の添加、続いてウェルH-11およびH-12への50μlのPBSの添加によって開始する。50μlのStimulation Bufferを全てのウェルに添加する。DMSO（または選択された候補化合物） 40
を、12μM試験化合物の最終アッセイ濃度および100μl総アッセイ容量で3μlの化合物溶液を分配し得るピンツールを用いて適切なウェルに添加する。次いで、細胞をウェルに添加し、そして室温で60分間にわたってインキュベートする。次いで、トレーサーcAMPを含有する100μlのDetection Mixをウェルに添加する。プレートをさらに2時間にわたってインキュベートし、続いてWallac MicroBetaTMシンチレーションカウンター中で計数する。次いで、cAMP/ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれる標準cAMP曲線から外挿する。

【0150】

（3．G_i共役標的GPCRについての細胞ベースのcAMP）

TSHRは、活性化されるとcAMPの蓄積を引き起こす、G_s共役GPCRである。T 50

S H R は、アミノ酸残基 6 2 3 を変異させる（すなわち、アラニン残基をイソロイシン残基に変更する）ことによって構成的に活性化される。G_i 共役レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害すると考えられ、それゆえ、c A M P 生成のレベルを低下させ、それによって、c A M P レベルの評価を魅力的にし得る。G_i 共役レセプターの構成的活性化の指標として c A M P の生成の減少を測定するための有効な技術は、「シグナルエンハンサー」として、（最も好ましくは非内因性の）構成的に活性化された T S H R（T S H R - A 6 2 3 I）（または内因性の構成的に活性な G_s 共役レセプター）を、G_i 連結標的 G P C R で同時トランスフェクトして、c A M P のベースラインレベルを確立することによって達成され得る。非内因性バージョンの G_i 共役レセプターが作製されたら、次いで、この非内因性バージョンの標的 G P C R を、このシグナルエンハンサーで同時トランスフェクトし、そしてスクリーニングに用いられ得るのはこの物質である。このアプローチを利用して、c A M P アッセイを用いる場合、シグナルを効果的に生じる；このアプローチは好ましくは、G_i 共役レセプターに対する候補化合物の直接同定において用いられる。G_i 共役 G P C R に関して、このアプローチを用いる場合、標的 G P C R の逆のアゴニストは、c A M P シグナルを増大させ、そしてアゴニストは c A M P シグナルを減少させることが注記される。

10

20

30

40

50

【0151】

1 日目に、 2×10^4 個の 2 9 3 細胞 / ウェルをプレーティングする。2 日目に、2 つの反応チューブを調製する（各チューブについての以下の比率は、1 プレートあたりである）：チューブ A は、哺乳動物細胞中にトランスフェクトされた各レセプターの DNA 2 μ g（合計 4 μ g DNA）（例えば、p C M V ベクター；変異した T H S R（T S H R - A 6 2 3 I）を有する p C M V ベクター；T S H R - A 6 2 3 I および G P C R など）を 1 . 2 m l 無血清 D M E M（I r v i n e S c i e n t i f i c , I r v i n e , C A）中に混合することによって調製される；チューブ B を、1 . 2 m l 無血清 D M E M 中に 1 2 0 μ l のリポフェクトアミン（G i b c o B R L）を混合することによって調製する。次いで、チューブ A およびチューブ B を、（数回）反転することによって混合し、続いて室温で 3 0 分間 ~ 4 5 分間にわたってインキュベートする。この混合物を、「トランスフェクション混合物」という。プレーティングした 2 9 3 細胞を $1 \times$ P B S で洗浄し、続いて 1 0 m l 無血清 D M E M を添加する。次いで、2 . 4 m l のトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて 3 7 / 5 % C O₂ で 4 時間にわたってインキュベートする。次いで、トランスフェクション混合物を吸引によって除去し、続いて 2 5 m l の D M E M / 1 0 % F e t a l B o v i n e S e r u m を添加する。次いで、細胞を 3 7 / 5 % C O₂ でインキュベートする。2 4 時間のインキュベーション後、細胞を収集し、そして分析のために利用する。

【0152】

F l a s h P l a t e ^{T M} A d e n y l y l C y c l a s e キット（N e w E n g l a n d N u c l e a r ; C a t . N o . S M P 0 0 4 A）は、細胞ベースのアッセイのために設計されたとはいえ、当業者の必要に依存して、粗製原形質膜についての使用のために改変され得る。F l a s h P l a t e ウェルは、c A M P を認識する特異抗体をまた含むシンチラントコーティングを含む。ウェル中で生成された c A M P を、c A M P 抗体への放射性 c A M P トレーサーの結合についての直接的競合によって定量し得る。以下は、このレセプターを発現する細胞全体における c A M P レベルの変化の測定のための簡略なプロトコルとして役立つ。

【0153】

トランスフェクトされた細胞を、一過性トランスフェクションの約 2 4 時間後に収集する。培地を注意深く吸引して捨てる。1 0 m l の P B S を、細胞の各ディッシュに穏やかに添加し、続いて注意深く吸引する。1 m l の S i g m a 細胞解離緩衝液および 3 m l の P B S を各プレートに添加する。細胞をピペットでプレートから取り出し、そして細胞懸濁液を 5 0 m l の円錐形遠心管に収集する。細胞を室温で、1 , 1 0 0 r p m で 5 分間遠心分離する。細胞ペレットを適切な容量の P B S（約 3 m l / プレート）中に注意深く再懸

濁する。次いで、細胞を、血球計算板を用いて計数し、そしてさらなるPBSを添加して、(約50 μ l/ウェルの最終容量になるように)適切な数の細胞を得る。

【0154】

cAMP標準およびDetection Buffer (11mlのDetection Bufferに対して1 μ Ciのトレーサー [1 2 5 I cAMP (50 μ l)]を含む)を、製造業者の指示に従って調製し、そして維持する。Assay Bufferを、スクリーニングのために新たに調製すべきであり、そしてこれは、50 μ lのStimulation Buffer、3 μ lの試験化合物 (12 μ Mの最終アッセイ濃度) および50 μ lの細胞を含むべきである。Assay Bufferを、利用するまで氷上で保存し得る。このアッセイを、適切なウェルへの50 μ lのcAMP標準の添加、続いてウェルH-11およびH12への50 μ lのPBSEAの添加によって開始し得る。50 μ lのStimulation Bufferを全てのウェルに添加する。選択された化合物 (例えば、TSH) を、12 μ M試験化合物の最終アッセイ濃度および100 μ l総アッセイ容量で3 μ lの化合物溶液を分配し得るピンツールを用いて適切なウェルに添加する。次いで、細胞をウェルに添加し、そして室温で60分間にわたってインキュベートする。次いで、トレーサーcAMPを含有する100 μ lのDetection Mixをウェルに添加する。次いで、プレートにさらに2時間にわたってインキュベートし、続いてWallac MicroBetaシンチレーションカウンター中で計数する。次いで、cAMP/ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれる標準cAMP曲線から外挿する。

10

20

【0155】

(4. レポーターベースのアッセイ)

(a. CRE-Lucレポーターアッセイ (G_s 結合レセプター))

293細胞および293T細胞を、96ウェルプレートに1ウェルあたり2 \times 10⁴細胞の密度でプレーティングし、そして翌日、製造業者の指示に従ってLipofectamine Reagent (BRL)を用いてトランスフェクトする。DNA/脂質混合物を、以下のとおりに各6ウェルトランスフェクションのために調製する: 100 μ lのDMEM中の260ngのプラスミドDNAを、100 μ lのDMEM中の脂質2 μ lと穏やかに混合する (260ngのプラスミドDNAは、8 \times CRE-Lucレポータープラスミド200ng、内因性レセプターもしくは非内因性レセプターを含むpCMVまたはpCMV単独 (50ng) およびGPRS発現プラスミド (pcDNA3 (Invitrogen) 中のGPRS) 10ngからなっていた)。8 \times CRE-Lucレポータープラスミドを以下のとおりに調製する: ベクターSRIF - galを、ラットソマトスタチンプロモーター (-71/+51) をp gal-Basic Vector (Clontech) 中のBglV-HindIII部位にクローニングすることによって得る。8コピーのcAMP応答エレメントを、アデノウイルステンプレートAdpCF126CCRE8 (7 Human Gene Therapy 1883 (1996)) を参照のこと) からのPCRによって得て、そしてSRIF - galベクター中のKpn-BglV部位にクローニングして、8 \times CRE - galレポーターベクターを得る。8 \times CRE-Lucレポータープラスミドを、8 \times CRE - galレポーターベクター中の - ガラクトシダーゼ遺伝子を、HindIII-BamHI部位にて、pGL3-basicベクター (Promega) 由来のルシフェラーゼ遺伝子で置換することによって生成する。室温での30分間のインキュベーション後、DNA/脂質混合物を400 μ lのDMEMで希釈し、そして100 μ lの希釈した混合物を各ウェルに添加する。10% FCSを含むDMEM 100 μ lを、細胞培養インキュベーター中での4時間のインキュベーション後に各ウェルに添加する。翌日、トランスフェクトした細胞を、10% FCSを含むDMEM (200 μ l/ウェル) を用いて交換する。8時間後、ウェルを、PBSで1回洗浄した後に、フェノールレッドを含まないDMEM (100 μ l/ウェル) に交換する。ルシフェラーゼ活性を、LucLiteTM レポーター遺伝子アッセイキット (Packard) を製造業者の指示に従って用いて翌日測定し、そして145

30

40

50

0 MicroBetaTM シンチレーションおよび発光カウンター (Wallac) で読み取る。

【0156】

(b. AP1 レポーターアッセイ (G_q 結合レセプター))

G_q 刺激を検出する方法は、AP1 エlement をプロモーター内に含む遺伝子の活性化を引き起こすという、G_q 依存性ホスホリパーゼCの既知の特性に依存する。Path detectorTM AP-1 cis-Reporting System (Stratagene, Catalogue # 219073) を、リン酸カルシウム沈澱物の成分が 410 ng pAP1-Luc、80 ng pCMV-レセプター発現プラスミドおよび 20 ng CMV-SEAP であること以外は、CREB レポーターアッセイに関する上記のプロトコルセットに従って利用し得る。 10

【0157】

(c. SRF-Luc レポーターアッセイ (G_q 結合レセプター))

G_q 刺激を検出する1つの方法は、血清応答因子をプロモーター中に含む遺伝子の活性化を引き起こすという、G_q 依存性ホスホリパーゼCの既知の特性に依存する。Path detectorTM SRF-Luc-Reporting System (Stratagene) を利用して、(例えば、COS7 細胞における) G_q 共役活性についてアッセイし得る。細胞を、Mammalian TransfectionTM Kit (Stratagene, Catalogue # 200285) を製造業者の指示に従って用いて、この系のプラスミド成分、および内因性または非内因性のGPCRをコードする示される発現プラスミドでトランスフェクトする。手短に述べると、410 ng SRF-Luc、80 ng pCMV-レセプター発現プラスミドおよび20 ng CMV-SEAP (分泌されるアルカリホスファターゼ発現プラスミド; アルカリホスファターゼ活性を、トランスフェクトした細胞の培地中で測定して、サンプル毎のトランスフェクション効率の変動を制御する) を、製造業者の指示に従って、リン酸カルシウム沈澱物中で合わせる。沈澱物の半分を、96 ウェルプレート中の3つのウェルの間で等しく分布させ、細胞を無血清培地中で24時間維持する。示される場合、最後の5時間において、細胞を1 μM Angiotensin とともにインキュベートする。次いで、細胞を溶解し、そしてLuc-liteTM Kit (Packard, Cat. # 6016911) および「Trilux 1450 Microbeta」液体シンチレーションおよび発光カウンター (Wallac) を製造業者の指示に従って用いて、ルシフェラーゼ活性についてアッセイする。このデータは、GraphPad PrismTM 2.0a (GraphPad Software Inc.) を用いて分析され得る。 20 30

【0158】

(d. 細胞内IP₃ 蓄積アッセイ (G_q 結合レセプター))

1日目に、レセプター (内因性および/または非内因性) を含む細胞を、通常 1×10^5 細胞/ウェルで (しかし、この数は最適化され得る) 24 ウェルプレートにプレATINGする。2日目に、細胞を、50 μl 無血清DMEM/ウェル中の0.25 μg DNA と、50 μl 無血清DMEM/ウェル中の2 μl リポフェクトアミンとを最初に混合することによってトランスフェクトする。この溶液を穏やかに混合し、そして15分間~30分間にわたって、室温でインキュベートする。次いで、細胞を0.5 ml PBS および 400 μl の無血清培地で洗浄し、次いでトランスフェクション培地と混合し、そして細胞に添加する。細胞を3時間~4時間にわたって37 / 5% CO₂ でインキュベートし、次いでトランスフェクション培地を除去し、そして1 ml / ウェルの通常の増殖培地と置き換える。3日目に細胞を³H-ミオ-イノシトールで標識する。手短に述べると、培地を除去し、そして細胞を0.5 ml PBS で洗浄する。次いで、1 ウェルあたり0.5 ml のイノシトール非含有/無血清培地 (GIBCO BRL) を、1 ウェルあたり0.25 μCi の³H-ミオ-イノシトールとともにウェルに添加し、そして細胞を16時間~18時間にわたって一晩、37 / 5% CO₂ でインキュベートする。4日目に、細胞を0.5 ml PBS で洗浄し、そしてイノシトール非含有/無血清培地、10 μ 40 50

Mパルグリン (p a r g y l i n e)、10 mM 塩化リチウムを含む0.45 mlのアッセイ培地または0.4 mlのアッセイ培地および10 μ Mの最終濃度にするための50 μ lの10 \times ケタンセリン (k e t) を添加する。次いで、細胞を30分間にわたって37 でインキュベートする。次いで、細胞を0.5 ml P B Sで洗浄し、そして200 μ lの新鮮/氷冷停止溶液 (1 M K O H ; 18 mM N a - ボレート ; 3.8 mM E D T A) を各ウェルに添加する。この溶液を氷上で5分間～10分間にわたって (または細胞が溶解するまで) 保持し、次いで200 μ lの新鮮/氷冷中和溶液 (7.5% H C L) によって中和する。次いで、溶解産物を1.5 mlのE p p e n d o r fチューブに移し、そして1チューブあたり1 mlのクロロホルム/メタノール (1:2) を添加する。この溶液を15秒間にわたってボルテックスにかけ、そして上層をB i o r a d A G 1 - X 8 ^{T M} 陰イオン交換樹脂 (100メッシュ～200メッシュ) に適用する。最初に、樹脂を1:1.25 W/Vの水で洗浄し、そして0.9 mlの上層をこのカラムにローディングする。次いでカラムを10 mlの5 mMミオ - イノシトールおよび10 mlの5 mM N a - ボレート / 60 mM N a - ホルメートで洗浄する。イノシトール t r i s ホスフェートを、2 mlの0.1 Mギ酸 / 1 Mギ酸アンモニウムを含むシンチレーションカクテル10 mlを含むシンチレーションバイアル中に溶出する。このカラムを、10 mlの0.1 Mギ酸 / 3 Mギ酸アンモニウムで洗浄することによって再生し、そしてd d H₂Oで2回リンスし、そして水中で4 で保存する。

10

【0159】

図1を参照する。図1では、293細胞を、6つのアミノ酸欠失を含むG_q タンパク質「G_q (d e l)」; G_i タンパク質に融合したG_q タンパク質「G_q (d e l) / G_i」; 内因性RUP32; およびG_q (d e l) を含むRUP32 (「RUP32 + G_q (d e l) / G_i」) でトランスフェクトした。このデータは、G_q (d e l) / G_i のRUP32同時トランスフェクションのIP₃蓄積を測定することに基づいて、RUP32がG_q タンパク質に内因的に共役しないことを示す。しかし、RUP32をG_q (d e l) / G_i 融合タンパク質で同時トランスフェクトした場合、RUP32は、G_q タンパク質に強制的に共役させられた。RUP27 + G_q (d e l) / G_i は、内因性RUP32と比較した場合の、IP₃蓄積における約9倍の増加を実証する。このデータは、G_q (d e l) / G_i F u s i o n C o n s t r u c tがG P C Rで同時トランスフェクトされ得、そしてアゴニストまたは逆のアゴニストについてスクリーニングするために用いられ得ることを実証する。

20

30

【0160】

図2を参照する。図2では、293細胞を、RUP35およびRUP36レセプターでトランスフェクトし、そしてコントロールのpCMVに対して比較した。このデータは、RUP35およびRUP36レセプターは両方とも内因性で構成的に活性であることを示す。RUP35は、pCMVと比較した場合の細胞内イノシトールホスフェート蓄積における約6倍の増加を実証し、そしてRUP36は、pCMVと比較した場合の約4倍の増加を実証する。

【0161】

(実施例5: 融合タンパク質の調製)

40

(a. GPCR: G_s 融合構築物)

構成的に活性化されたGPCR - Gタンパク質の融合構築物の設計を以下のとおりに達成し得る: ラットGタンパク質G_s (長い形態; I t o h , H . ら , 83 P N A S 3776 (1986)) の5'末端および3'末端の両方を操作して、その中にH i n d I I I (5' - A A G C T T - 3') 配列を含ませる。正確な配列 (隣接するH i n d I I I 配列を含む) の確認後、配列全体を、ベクターのH i n d I I I 制限部位にサブクロニングすることによって、p c D N A 3.1 (-) (I n v i t r o g e n , c a t . n o . V 795 - 20) 中にシャトルする。G_s 配列についての正確な方向を、p c D N A 3.1 (-) へのサブクロニング後に決定する。次いで、H i n d I I I 配列にラットG_s 遺伝子を含む改変されたp c D N A 3.1 (-) を確認する; 次いで、このベクタ

50

ーは、「ユニバーサル」G_s。タンパク質ベクターとして利用可能である。p c D N A 3 . 1 (-) ベクターは、H i n d I I I 部位の上流に種々の周知の制限部位を含み、従ってG_s。タンパク質の上流に、内因性の構成的に活性なG P C R のコード配列を挿入する能力を有益に提供する。この同じアプローチを利用して、他の「ユニバーサル」G タンパク質ベクターを作製し得、そしてもちろん、当業者に公知の他の市販または特許のベクターが利用され得る。いくつかの実施形態では、重要な基準は、G P C R についての配列がG タンパク質の配列の上流でかつインフレームに存在することである。

【0162】

G タンパク質とG P C R との間の制限部位におけるスペーサーは、任意である。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、スペーサー（制限部位に起因する）がG タン

10

【0163】

次いで、P C R を利用して、各々について以下のプロトコルを用いて、融合のためのそれぞれのレセプター配列が、上記で開示されたG_s。ユニバーサルベクター内にあることを確実にする：G P C R についてのc D N A (1 0 0 n g) を、以下を含む別々のチューブに添加する：2 μ l の各プライマー（センスおよびアンチセンス）、3 μ l の1 0 m M d N T P、1 0 μ l の1 0 × T a q P l u s ^{T M} P r e c i s i o n 緩衝液、1 μ l のT a q P l u s ^{T M} P r e c i s i o n ポリメラーゼ（S t r a t a g e n e : # 6 0 0 2 1 1）および8 0 μ l の水。G P C R についての反応温度およびサイクル回数は、サイ

20

【0164】

(b . G_q (6 アミノ酸欠失) / G_i 融合構築物)

G_q (d e l) / G_i 融合構築物の設計を、以下のとおりに達成した：T L E S I M (配列番号 4 7) という配列を有するN末端の6 アミノ酸（アミノ酸 2 ~ 7）であるG_q サブユニットを欠失させ、そして配列 E Y N L V (配列番号 4 8) を有するC末端の5 アミノ酸を、配列 D C G L F (配列番号 4 9) を有する、G_i タンパク質の対応するアミノ酸で置換した。この融合構築物を、以下のプライマーおよびテンプレートとしてのプラスミド 6 3 3 1 3 (赤血球凝集素タグを有するマウス G_q - 野生型バージョンを含む) を用いた P C R によって入手した：5' - g a t c A A G C T T C C A T G G C G T G C T G C C T G A G C G A G G - 3' (配列番号 5 0) および 5' - g a t c G G A T C C T T A G A A C A G G C C G C A G T C C T T C A G G T T C A G C T G C A G G A T G G T G - 3' (配列番号 5 1)。小文字 (l o w e r c a p) のヌクレオチドは、スペー

30

40

【0165】

T a q P l u s (登録商標) P r e c i s i o n D N A ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を、工程 2 ~ 工程 4 を 3 5 回繰り返す以下のサイクルによる増幅のために利用した：9 5 で 2 分間；9 5 で 2 0 秒間；5 6 で 2 0 秒間；7 2 で 2 分間；そして 7 2 で 7 分間。P C R 産物を p C R I I - T O P O ベクター (I n v i t r o g e n) 中にクローニングし、そして A B I B i g D y e T e r m i n a t o r キット (P . E . B i o s y s t e m s) を用いて配列決定する。融合構築物の配列を含む T O P O クローン由来の挿入物を、発現ベクター p c D N A 3 . 1 (+) に、2 工程クローニングプロセスによって H i n d I I I / B a m H I 部位にシャトルする。

50

【 0 1 6 6 】

(実施例 6 : 開示されたヒト G P C R の組織分布 : R T - P C R)

R T - P C R を適用して発現を確認し、そしていくつかの新規ヒト G P C R の組織分布を決定した。利用したオリゴヌクレオチドは G P C R 特異的であり、そしてヒト複数組織 c D N A パネル (M T C , C l o n t e c h) をテンプレートとして使用した。T a q D N A ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を、4 0 μ l 反応物において、製造業者の指示にしたがって増幅のために利用した。2 0 μ l の反応物を 1 . 5 % アガロースゲルにローディングして、R T - P C R 産物を分析する。以下の表 E は、レセプター、サイクル条件および利用したプライマーを列挙し、そしてまたこれらのレセプターに関連した例示的な疾患 / 障害を列挙する。

【 0 1 6 7 】

【 表 6 】

表 E

レセプター 識別名	サイクル条件 分 (') , 秒 (") サイクル 2-4 を 35 回 繰り返した	5'プライマー (配列番号)	3'プライマー (配列番号) プライマー	DNA フラグメント	組織発現
hRUP28	94°C で 5 分間 ; 94°C で 30 秒間 ; 58°C で 30 秒間 , 72°C で 1 分間 , そ して 72°C で 7 分間	GTCCTCACT GGTGGCCAT GTACTCC (52)	CTGCGTCCAC CAGAGTCAC GTCTCC (53)	710bp	心臓 ; 腎臓 ; 肝臓 ; 肺および脾臓
hRUP29	94°C で 5 分間 ; 94°C で 30 秒間 ; 58°C で 30 秒間 , 72°C で 1 分間 , そ して 72°C で 7 分間	CTTGGATGTT TGGGCTGCC CTTCTGC (54)	GTTTGTGGCT AACGGCACA AAACACAAT TCC (55)	690bp	白血球および卵巣

【 0 1 6 8 】

10

20

30

(表Eの続き)

hRUP30	94°Cで2分間; 94°Cで15秒間; 58°Cで20秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで10分間	CTGCTCACG GTTGACCGC TACACTGC (56)	GTGGCCATG AGCCACCCCT GAGCTCC (57)	690bp	脾臓
hRUP31	95°Cで4分間; 95°Cで1分間; 52°Cで30秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで7分間	CTTCTTCTCC GACGTCAAG G (58)	CCAAATCA GTGTGCAA ATCG (59)	516bp	結腸、肺、脾臓、胸 腺; 大脳皮質、脳の 海馬および脂肪細胞
hRUP32	95°Cで4分間; 95°Cで1分間; 52°Cで30秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで7分間	TGAATGGGT CCTGTGTGA AA (60)	CAACGGTCT GACAACCTC CT (61)	527bp	胸腺
hRUP34	95°Cで4分間; 95°Cで1分間; 52°Cで30秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで7分間	TTGCTGTGAT GTGGCATTIT G (62)	CAGGAAGCC CATAAAGGC ATCAA (63)	534bp	末梢血白血球 (「PBL」) 前立腺および腎臓
hRUP35	95°Cで4分間; 95°Cで1分間; 52°Cで30秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで7分間	ACATCACCT GCTTCCTGA CC (64)	CCAGCATCTT GATGCAGTG T (65)	557bp	視床
hRUP37	95°Cで4分間; 95°Cで1分間; 52°Cで30秒間, 72°Cで1分間,そ して72°Cで7分間	CCATCTCCA AAATCCICA GTC (66)	GCTGTTAAG AGCGGACAG GAAA (67)	517bp	精巣、大脳皮質およ び海馬

10

20

30

40

50

【0169】

これらの組織または領域に位置するレセプターに関連する疾患および障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：心臓の障害および疾患（例えば、血栓症、心筋梗塞；アテローム性動脈硬化症；心筋症）；腎臓の疾患／障害（例えば、腎不全；尿細管性アシドーシス；腎性糖尿；腎性尿崩症；シスチン尿；多発性嚢胞腎疾患）；好酸球増加症；白血球増加症；白血球減少症；卵巣癌；性機能障害；多嚢胞性卵巣症候群；脾炎および脾臓癌；過敏性腸症候群；結腸癌；クローン病；潰瘍性大腸炎；憩室炎；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；嚢胞性線維症；肺炎；肺高血圧症；結核および肺癌；パーキンソン病；運動障害および運動失調；学習障害および記憶障害；摂食障害（例えば、食欲不振；過食

症など)；肥満症；癌；胸腺腫；重症筋無力症；循環器障害；前立腺癌；前立腺炎；腎臓の疾患／障害（例えば、腎不全；尿細管性アシドーシス；腎性糖尿；腎性尿崩症；シスチン尿；多発性嚢胞腎臓疾患）；感覚運動処理障害および覚醒障害；強迫性障害；精巣癌；持続勃起；前立腺炎；ヘルニア；内分泌障害；性機能障害；アレルギー；鬱病；精神障害；片頭痛；灌流；精神分裂病；潰瘍；気管支痙攣；癲癇；前立腺肥大；不安；鼻炎；アンギナ；および緑内障。従って、本発明の方法はまた、これらおよび他の疾患および障害の診断および／または処置において有用であり得る。

【0170】

(実施例7：プロトコル：逆のアゴニストおよびアゴニストの直接同定)

(A. [³⁵S]GTP アッセイ)

10

内因性の構成的に活性なGPCRは、完全には理解されていないという理由から、例えば、逆のアゴニストとしての候補化合物の直接同定のために用いられているが、アッセイ内変動が悪化することになり得る。いくつかの実施形態では、上記に開示されたとおりのGPCR融合タンパク質はまた、非内因性の構成的に活性化されたGPCRと一緒に利用される。このようなタンパク質が用いられる場合、アッセイ内変動は、実質的に安定化されるようであり、それによって有効なシグナル対ノイズ比が得られる。これは、候補化合物のより頑健な同定を可能にするという有益な結果を有する。従って、いくつかの実施形態では、直接同定のためにGPCR融合タンパク質を用いることが好ましく、そして利用する場合、以下のアッセイプロトコルを利用することが好ましい。

【0171】

20

(1. 膜の調製)

構成的に活性な、目的のオーファンGPCR融合タンパク質を含み、そして逆のアゴニストまたはアゴニストとしての候補化合物の直接同定において使用するための膜は好ましくは以下のとおりに調製される：

(a. 材料)

「Membrane Scrape Buffer」は、20mM HEPESおよび10mM EDTA (pH 7.4) から構成される；「Membrane Wash Buffer」は、20mM HEPESおよび0.1mM EDTA (pH 7.4) から構成される；「Binding Buffer」は、20mM HEPES、100mM NaClおよび10mM MgCl₂ (pH 7.4) 構成される。

30

【0172】

(b. 手順)

全ての材料を、手順をとおして氷上に保持する。最初に、培地を、コンフルエントな単層の細胞から吸引し、続いて10mlの冷PBSでリンスし、続いて吸引する。その後、5mlのMembrane Scrape Bufferを添加して、細胞を掻きとる；これに続いて、細胞抽出物を50ml遠心管に移す(20,000rpmで17分間、4で遠心分離する)。その後、上清を吸引し、そしてペレットを30ml Membrane Wash Buffer中に再懸濁し、続いて20,000rpmで17分間、4で遠心分離する。次いで、上清を吸引し、そしてペレットをBinding Buffer中に再懸濁する。次いで、再懸濁したペレットを、Brinkman PolytronTM ホモジナイザー(材料が懸濁するまで、15~20秒間のバースト)を用いて均質化する。これを本明細書中では、「膜タンパク質(Membrane Protein)」という。

40

【0173】

(2. Bradfordタンパク質アッセイ)

均質化後、膜のタンパク質濃度を、例えば、Bradford Protein Assayを用いて決定する(タンパク質を、約1.5mg/mlになるように希釈し、アリコートに分け、そして後の使用まで凍結(-80)し得る；凍結した場合、使用のためのプロトコルは、以下のとおりである：アッセイの当日に、凍結した膜タンパク質を室温で解凍し、続いてボルテックスにかけ、次いでPolytronを約12x1,000rp

50

mで約5～10秒間用いて均質化する；複数の調製に関して、ホモジナイザーを異なる調製物の均質化の間に徹底的に浄化することに留意した）。

【0174】

(a. 材料)

Binding Buffer (上記のとおり) ; Bradford Dye Reagent ; Bradford Protein Standardを、製造業者の指示 (Biorad, cat. no. 5000006) に従って利用する。

【0175】

(b. 手順)

二連のチューブを調製し、一方は、膜を含み、そして他方はコントロールの「ブランク」である。各々は、800 μ lのBinding Bufferを含む。その後、10 μ lのBradford Protein Standard (1mg/ml)を各チューブに添加し、次いで10 μ lの膜Proteinを、(ブランクではない)1つのチューブにのみ添加する。その後、200 μ lのBradford Dye Reagentを各チューブに添加し、続いてボルテックスにかける。5分後、チューブを再度ボルテックスにかけ、そしてその中の材料をキュベットに移す。次いで、キュベットを、CECIL 3041分光光度計を用いて波長595で読み取る。

【0176】

(3. 直接同定アッセイ)

(a. 材料)

GDP Bufferは、37.5ml Binding Bufferおよび2mg GDP (Sigma, cat. no. G7127) からなっており、続いて、Binding Buffer中での一連の希釈によって0.2 μ M GDPを得た (各ウェル中でのGDPの最終濃度は0.1 μ M GDPであった) ; 候補化合物を含む各ウェルは、GDP Buffer (最終濃度0.1 μ M GDP) (100 μ l)、Binding Buffer中の膜タンパク質 (50 μ l) およびBinding Buffer中の [³⁵S] GTP S (0.6 nM) (50 μ l) (10ml Binding Bufferあたり2.5 μ lの [³⁵S] GTP S) からなる、200 μ lの最終容量を有する。

【0177】

(b. 手順)

候補化合物を好ましくは、96ウェルプレート形式 (これらは-80 で凍結され得る) を用いてスクリーニングする。膜タンパク質 (またはコントロールとして、GPCR融合タンパク質を除く発現ベクターを含む膜) を、懸濁するまで短時間均質化する。次いで、タンパク質濃度を、例えば、上記のBradford Protein Assayを用いて決定する。次いで、膜タンパク質 (およびコントロール) を、Binding Buffer中に0.25mg/mlになるように希釈する (最終アッセイ濃度、12.5 μ g/ウェル)。その後、100 μ lのGDP Bufferを、Wallac ScintistripTM (Wallac) の各ウェルに添加する。次いで、5 μ lのピンツールを用いて、5 μ lの候補化合物をこのようなウェル中に移す (すなわち、200 μ lの総アッセイ容積中の5 μ lは、40:1の比であり、その結果、候補化合物の最終スクリーニング濃度は、10 μ Mである)。さらに、夾雑を回避するために、各移動工程の後に、ピンツールを、水 (1x)、エタノール (1x) および水 (2x) を含む3つのレザバ中でリンスする - 過剰の液体を、各リンスの後にツールから振り落とし、そしてツールを紙およびキムワイブで乾燥させる。その後、50 μ lの膜タンパク質を各ウェルに添加し (GPCR融合タンパク質を含まず、膜を含むコントロールウェルもまた利用した)、そして5分間～10分間、室温でプレインキュベートする。その後、Binding Buffer中の [³⁵S] GTP S (0.6 nM) (50 μ l) を各ウェルに添加し、続いてシェーカーで60分間にわたって、室温でインキュベートする (さらに、この実施例において、プレートをホイルで覆った)。プレートを4000RPMで15分間にわたっ

て22でスピンすることによってアッセイを停止させる。次いで、プレートに8チャンネルマニホールドで吸引し、そしてプレートカバーでシールする。次いで、プレートを、(製造業者の指示に従って)Wallac 1450で「Prot. #37」の設定を用いて読み取る。

【0178】

(B. サイクリックAMPアッセイ)

候補化合物を直接的に同定するための別のアッセイアプローチを、シクラーゼベースのアッセイを利用して達成する。直接的同定に加えて、このアッセイアプローチを、上記のとおり[³⁵S]GTP Sアプローチからの結果の確認を提供する、独立したアプローチとして利用し得る。

10

【0179】

改変版Flash PlateTM Adenylyl Cyclaseキット(New England Nuclear; Cat. No. SMP004A)を好ましくは、以下のプロトコルに従って、GPCRに対する逆のアゴニストおよびアゴニストとしての候補化合物の直接同定のために用いる。

【0180】

トランスフェクトされた細胞を、トランスフェクションの約3日後に収集する。膜を、20 mM HEPES (pH 7.4)および10 mM MgCl₂を含む緩衝液中での懸濁細胞の均質化によって調製する。均質化を、Brinkman PolyttronTMを用いて氷上で約10秒間にわたって行う。得られるホモジネートを、49,000 × gで15分間にわたって、4で遠心分離する。次いで、得られるペレットを、20 mM HEPES (pH 7.4)および0.1 mM EDTAを含む緩衝液中に再懸濁し、10秒間均質化し、続いて49,000 × gで15分間にわたって4で遠心分離する。次いで、得られるペレットを、利用するまで-80で保存する。直接同定スクリーニングの当日に、膜ペレットを室温でゆっくりと解凍し、20 mM HEPES (pH 7.4)および10 mM MgCl₂を含む緩衝液中に再懸濁して、0.60 mg/mlの最終タンパク質濃度を得る(再懸濁した膜を、使用するまで氷上に置く)。

20

【0181】

cAMP標準およびDetection Buffer (2 μCiのトレーサー [¹²⁵I] cAMP (100 μl)を11 mlのDetection Bufferに含む)を、製造業者の指示に従って調製し、そして維持する。Assay Bufferをスクリーニングのために新鮮に調製し、そしてこれは、20 mM HEPES (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、20 mM ホスホクレアチン (Sigma)、0.1 単位/mlのクレアチンホスホキナーゼ (Sigma)、50 μM GTP (Sigma)および0.2 mM ATP (Sigma)を含む; Assay Bufferを、利用するまで氷上で保存する。

30

【0182】

上記によって同定された候補化合物(凍結した場合、室温で解凍する)を、好ましくは96ウェルプレートウェル(3 μl/ウェル; 12 μM最終アッセイ濃度)に、40 μlの膜タンパク質(30 μg/ウェル)および50 μlのAssay Bufferと一緒に添加する。この混合物を、穏やかに攪拌しながら、30分間にわたって室温でインキュベートする。

40

【0183】

インキュベーション後、100 μlのDetection Bufferを各ウェルに添加し、続いて2~24時間にわたってインキュベートする。次いで、プレートを、Wallac MicroBetaTMプレートリーダーにおいて、「Prot. #31」(製造業者の指示によって)を用いて計数する。

【0184】

(C. メラニン保有細胞スクリーニングアッセイ)

GPCRについての候補アゴニストまたは逆のアゴニストを同定するための方法を、特定

50

の刺激に応じて色素を分散または凝集し得、そしてGPCRをコードする外因性クローンを発現する、色素細胞株の試験細胞を導入することによって実施し得る。GPCRの活性化が色素の分散を誘導する場合、刺激因子（例えば、光）は、色素が試験細胞内に凝集している、凝集配置の最初の状態を設定する。しかし、GPCRの活性化が色素の凝集を誘導する場合、細胞を刺激因子で刺激して、色素が分散されている、色素配置の最初の状態を設定する。次いで、試験細胞を化合物と接触させ、そして細胞内での色素の配置が、色素の配置の最初の状態から変化したか否かを決定する。色素細胞の分散は、GPCRへの候補化合物のカップリングに起因して、ペトリ皿では暗く見え、一方、色素細胞の凝集は明るく見える。

【0185】

材料および方法は、米国特許第5,462,856号および米国特許第6,051,386号（これらの各々は、参考として援用される）の開示に従う。

【0186】

種々の発現ベクターは当業者に入手可能であるが、内因性ヒトGPCRおよび非内因性ヒトGPCRの両方について利用する目的のためには、いくつかの実施形態では、利用されるベクターがpCMVであることが好ましい。このベクターを、American Type Culture Collection (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に1998年10月13日に、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規約の下で寄託した。このDNAは、ATCCによって試験されて、生存していることが決定された。ATCCは、pCMVに以下の受託番号を割り当てた：ATCC # 203351。

【0187】

本特許文書を通じて引用される参考文献は、同時係属中の特許出願および関連の特許出願を含め、他に示されない限り、本明細書中に参考として十分に援用される。当業者の範囲内にある、開示された発明の改変および拡大は、上記の開示および上記の特許請求の範囲内に包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、セカンドメッセンジャーアッセイにおける、RUP32、 $G_q(del)/G_i$ 、 $G_q(del)/G_i$ と同時トランスフェクトしたRUP32、およびCMV（コントロール；発現ベクター）の活性化のグラフ表示であり、このアッセイは、293細胞を使用して、イノシトールリン酸塩（IP₃）の蓄積を測定する。

【図2】

図2は、コントロール（「CMV」）と比較した、内因性バージョンのRUP35およびRUP36からのセカンドメッセンジャーIP₃の生成の図示を提供する。

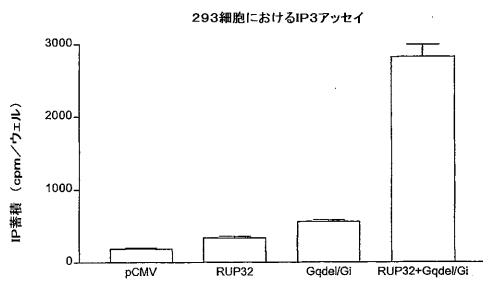
10

20

30

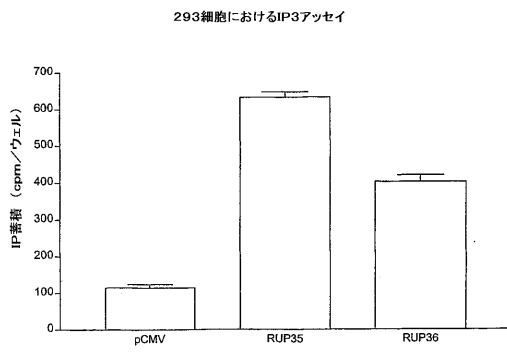
【図 1】

Figure 1



【図 2】

Figure 2



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

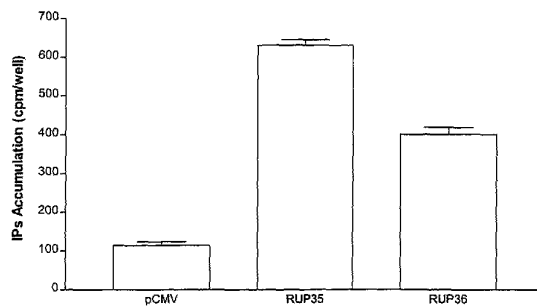
(10) International Publication Number
WO 02/42461 A2

- (51) International Patent Classification: **C12N 15/12**,
C07K 14/705
- (71) Applicant (for all designated States except US): **ARENA PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US], 6166 Nancy Drive, San Diego, CA 92121 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/44386
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **CHEN, Ruoping** [CN/US]; 5296 Timber Branch Way, San Diego, CA 92150 (US). **CHU, Zhi, Liang** [CN/US]; 11489 Creekstone Lane, San Diego, CA 92128 (US). **DANG, Huong, T.** [VN/US]; 5352 Oak Park Drive, San Diego, CA 92105 (US). **LOWITZ, Kevin, P.** [US/US]; 8031 Caminito de Pizza, Apt. C, San Diego, CA 92108 (US). **PRIDE, Cameron** [US/US]; 11026 West Ocean Air Drive #1128, San Diego, CA 92130 (US).
- (22) International Filing Date:
26 November 2001 (26.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/253,404 27 November 2000 (27.11.2000) US
60/255,366 12 December 2000 (12.12.2000) US
60/270,266 20 February 2001 (20.02.2001) US
60/270,286 20 February 2001 (20.02.2001) US
60/282,032 6 April 2001 (06.04.2001) US
60/282,356 6 April 2001 (06.04.2001) US
60/282,358 6 April 2001 (06.04.2001) US
60/282,365 6 April 2001 (06.04.2001) US
60/290,917 14 May 2001 (14.05.2001) US
60/309,208 31 July 2001 (31.07.2001) US
- (74) Agents: **STRAHER, Michael, P.** et al., Woodcock Washburn LLP, 46th floor, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: ENDOGENOUS AND NON-ENDOGENOUS VERSIONS OF HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

IP3 Assay in 293 Cells



(57) Abstract: The invention disclosed in this patent document relates to transmembrane receptors, more particularly to a human G protein-coupled receptor for which the endogenous ligand is unknown, and to mutated (non-endogenous) versions of the human GPCRs for evidence of constitutive activity.

WO 02/42461 A2

WU 02/42461 A2



MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished
upon receipt of that report*

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.*

**ENDOGENOUS AND NON-ENDOGENOUS VERSIONS OF
HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is a continuation-in-part of U.S. Serial Number 09/170,496, filed with the United States Patent and Trademark Office on October 13, 1998 and its corresponding PCT application number PCT/US99/23938, published as WO 00/22129 on April 20, 2000. This document claims the benefit of priority from the following provisional applications, all filed via U.S. Express Mail with the United States Patent and Trademark Office on the indicated dates: U.S. Provisional Number 60/253,404, filed November 27, 2000; U.S. Provisional Number 60/255,366, filed December 12, 2000; U.S. Provisional Number 60/270,286 filed February 20, 2001; U.S. Provisional Number 60/282,356, filed April 6, 2001, which claims priority from U.S. Provisional Number 60/270,266, filed February 20, 2001; U.S. Provisional Number 60/282,032, filed April 6, 2001; U.S. Provisional Number 60/282,358, filed April 6, 2001; U. S. Provisional Number 60/282,365, filed April 6, 2001; U.S. Provisional Number 60/290,917, filed May 14, 2001; U.S. Provisional Number 60/309,208, filed July 31, 2001; the disclosures of which are incorporated in their entirety by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to transmembrane receptors, in some embodiments to G protein-coupled receptors and, in some preferred embodiments, to endogenous GPCRs that are altered to establish or enhance constitutive activity of the receptor. In some embodiments, the constitutively activated GPCRs will be used for the direct identification of candidate compounds as receptor agonists or inverse agonists having applicability as therapeutic agents.

PATENT

BACKGROUND OF THE INVENTION

Although a number of receptor classes exist in humans, by far the most abundant and therapeutically relevant is represented by the G protein-coupled receptor (GPCR) class.

5 It is estimated that there are some 30,000-40,000 genes within the human genome, and of these, approximately 2% are estimated to code for GPCRs. Receptors, including GPCRs, for which the endogenous ligand has been identified, are referred to as "known" receptors, while receptors for which the endogenous ligand has not been identified are referred to as "orphan" receptors.

10 GPCRs represent an important area for the development of pharmaceutical products: from approximately 20 of the 100 known GPCRs, approximately 60% of all prescription pharmaceuticals have been developed. For example, in 1999, of the top 100 brand name prescription drugs, the following drugs interact with GPCRs (diseases and/or disorders treated are indicated in parentheses):

15	Claritin® (allergies)	Prozac® (depression)	Vasotec® (hypertension)
	Paxil® (depression)	Zoloft® (depression)	Zyprexa ® (psychotic disorder)
	Cozaar® (hypertension)	Imitrex® (migraine)	Zantac® (reflux)
	Propulsid® (reflux disease)	Risperdal® (schizophrenia)	Serevent® (asthma)
	Pepcid® (reflux)	Gaster® (ulcers)	Atrivent® (bronchospasm)
20	Effexor® (depression)	Depakote® (epilepsy)	Cardura® (prostatic hypertrophy)
	Allegra® (allergies)	Lupron® (prostate cancer)	Zoladex® (prostate cancer)
	Diprivan® (anesthesia)	BuSpar® (anxiety)	Ventolin® (bronchospasm)
	Hytrin® (hypertension)	Wellbutrin® (depression)	Zyrtec® (rhinitis)
	Plavix® (MI/stroke)	Toprol-XL® (hypertension)	Tenormin® (angina)
25	Xalatan® (glaucoma)	Singulair® (asthma)	Diovan® (hypertension)
	Harnal® (prostatic hyperplasia)		

(Med Ad News 1999 Data).

30 GPCRs share a common structural motif, having seven sequences of between 22 to 24 hydrophobic amino acids that form seven alpha helices, each of which spans the membrane (each span is identified by number, *i.e.*, transmembrane-1 (TM-1), transmembrane-2 (TM-2), *etc.*). The transmembrane helices are joined by strands of amino acids between transmembrane-2 and transmembrane-3, transmembrane-4 and transmembrane-5, and transmembrane-6 and transmembrane-7 on the exterior, or

AREN-0309

PATENT

“extracellular” side, of the cell membrane (these are referred to as “extracellular” regions 1, 2 and 3 (EC-1, EC-2 and EC-3), respectively). The transmembrane helices are also joined by strands of amino acids between transmembrane-1 and transmembrane-2, transmembrane-3 and transmembrane-4, and transmembrane-5 and transmembrane-6 on the interior, or “intracellular” side, of the cell membrane (these are referred to as “intracellular” regions 1, 2 and 3 (IC-1, IC-2 and IC-3), respectively). The “carboxy” (“C”) terminus of the receptor lies in the intracellular space within the cell, and the “amino” (“N”) terminus of the receptor lies in the extracellular space outside of the cell.

Generally, when an endogenous ligand binds with the receptor (often referred to as “activation” of the receptor), there is a change in the conformation of the intracellular region that allows for coupling between the intracellular region and an intracellular “G-protein.” It has been reported that GPCRs are “promiscuous” with respect to G proteins, *i.e.*, that a GPCR can interact with more than one G protein. *See*, Kenakin, T., 43 *Life Sciences* 1095 (1988). Although other G proteins exist, currently, G_q, G_s, G_i, G_z and G_o are G proteins that have been identified. Ligand-activated GPCR coupling with the G-protein initiates a signaling cascade process (referred to as “signal transduction”). Under normal conditions, signal transduction ultimately results in cellular activation or cellular inhibition. Although not wishing to be bound to theory, it is thought that the IC-3 loop as well as the carboxy terminus of the receptor interact with the G protein.

Under physiological conditions, GPCRs exist in the cell membrane in equilibrium between two different conformations: an “inactive” state and an “active” state. A receptor in an inactive state is unable to link to the intracellular signaling transduction pathway to initiate signal transduction leading to a biological response. Changing the receptor conformation to the active state allows linkage to the transduction pathway (via the G-protein) and produces a biological response.

A receptor may be stabilized in an active state by a ligand or a compound such as a drug. Recent discoveries, including but not exclusively limited to modifications to the amino acid sequence of the receptor, provide means other than ligands or drugs to promote and stabilize the receptor in the active state conformation. These means effectively stabilize the receptor in an active state by simulating the effect of a ligand binding to the receptor. Stabilization by such ligand-independent means is termed “constitutive receptor activation.”

AREN-0309

PATENT

SUMMARY OF THE INVENTION

Disclosed herein are endogenous and non-endogenous versions of human GPCRs and uses thereof.

5 Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:2, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:1 and host cells comprising the same.

10 Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:4, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:3, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

15 Some embodiments of the present invention relate to G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:6, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:5 and host cells comprising the same.

20 Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:8, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

25 Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:7, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:10, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

30 Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:9 and host cells comprising the same.

AREN-0309**PATENT**

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:12, non-endogenous, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:11, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:14, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:13 and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:16, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:15 and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:18, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:17 and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ.ID.NO.:20, constitutively activated versions of the same, and host cells comprising the same.

Some embodiments of the present invention relate to a plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:19 and host cells comprising the same.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a graphic representation of activation of RUP32, $G_q(\text{del})/G_i$, RUP32 co-transfected with $G_q(\text{del})/G_i$, and CMV (control; expression vector) in a second messenger assay measuring the accumulation of inositol phosphate (IP_3) utilizing 293 cells.

Figure 2 provides an illustration of second messenger IP_3 production from endogenous version RUP35 and RUP36 as compared with the control ("CMV").

AREN-0309

PATENT

DETAILED DESCRIPTION

The scientific literature that has evolved around receptors has adopted a number of terms to refer to ligands having various effects on receptors. For clarity and consistency, the following definitions will be used throughout this patent document. To the extent that these definitions conflict with other definitions for these terms, the following definitions shall control:

AGONISTS shall mean materials (*e.g.*, ligands, candidate compounds) that activate the intracellular response when they bind to the receptor, or enhance GTP binding to membranes. In some embodiments, **AGONISTS** are those materials not previously known to activate the intracellular response when they bind to the receptor or to enhance GTP binding to membranes.

AMINO ACID ABBREVIATIONS used herein are set out in Table A:

TABLE A

ALANINE	ALA	A
ARGININE	ARG	R
ASPARAGINE	ASN	N
ASPARTIC ACID	ASP	D
CYSTEINE	CYS	C
GLUTAMIC ACID	GLU	E
GLUTAMINE	GLN	Q
GLYCINE	GLY	G
HISTIDINE	HIS	H
ISOLEUCINE	ILE	I
LEUCINE	LEU	L
LYSINE	LYS	K

AREN-0309

PATENT

METHIONINE	MET	M
PHENYLALANINE	PHE	F
PROLINE	PRO	P
SERINE	SER	S
THREONINE	THR	T
TRYPTOPHAN	TRP	W
TYROSINE	TYR	Y
VALINE	VAL	V

ANTAGONIST shall mean materials (*e.g.*, ligands, candidate compounds) that competitively bind to the receptor at the same site as the agonists but which do not activate the intracellular response initiated by the active form of the receptor, and can thereby inhibit the intracellular responses by agonists. **ANTAGONISTS** do not diminish the baseline intracellular response in the absence of an agonist. In some embodiments, **ANTAGONISTS** are those materials not previously known to activate the intracellular response when they bind to the receptor or to enhance GTP binding to membranes.

CANDIDATE COMPOUND shall mean a molecule (for example, and not limitation, a chemical compound) that is amenable to a screening technique. Preferably, the phrase "candidate compound" does not include compounds which were publicly known to be compounds selected from the group consisting of inverse agonist, agonist or antagonist to a receptor, as previously determined by an indirect identification process ("indirectly identified compound"); more preferably, not including an indirectly identified compound which has previously been determined to have therapeutic efficacy in at least one mammal; and, most preferably, not including an indirectly identified compound which has previously been determined to have therapeutic utility in humans.

COMPOSITION means a material comprising at least one component; a "pharmaceutical composition" is an example of a composition.

COMPOUND EFFICACY shall mean a measurement of the ability of a compound to inhibit or stimulate receptor functionality; i.e. the ability to activate/inhibit a

AREN-0309**PATENT**

signal transduction pathway, as opposed to receptor binding affinity. Exemplary means of detecting compound efficacy are disclosed in the Example section of this patent document.

CODON shall mean a grouping of three nucleotides (or equivalents to nucleotides) which generally comprise a nucleoside (adenosine (A), guanosine (G), cytidine (C), uridine (U) and thymidine (T)) coupled to a phosphate group and which, when translated, encodes an amino acid.

CONSTITUTIVELY ACTIVATED RECEPTOR shall mean a receptor subjected to constitutive receptor activation. A constitutively activated receptor can be endogenous or non-endogenous.

CONSTITUTIVE RECEPTOR ACTIVATION shall mean stabilization of a receptor in the active state by means other than binding of the receptor with its ligand or a chemical equivalent thereof.

CONTACT or **CONTACTING** shall mean bringing at least two moieties together, whether in an in vitro system or an in vivo system.

DIRECTLY IDENTIFYING or **DIRECTLY IDENTIFIED**, in relationship to the phrase "candidate compound", shall mean the screening of a candidate compound against a constitutively activated receptor, preferably a constitutively activated orphan receptor, and most preferably against a constitutively activated G protein-coupled cell surface orphan receptor, and assessing the compound efficacy of such compound. This phrase is, under no circumstances, to be interpreted or understood to be encompassed by or to encompass the phrase "indirectly identifying" or "indirectly identified."

ENDOGENOUS shall mean a material that a mammal naturally produces. **ENDOGENOUS** in reference to, for example and not limitation, the term "receptor," shall mean that which is naturally produced by a mammal (for example, and not limitation, a human) or a virus. By contrast, the term **NON-ENDOGENOUS** in this context shall mean that which is not naturally produced by a mammal (for example, and not limitation, a human) or a virus. For example, and not limitation, a receptor which is not constitutively active in its endogenous form, but when manipulated becomes constitutively active, is most preferably referred to herein as a "non-endogenous, constitutively activated receptor." Both terms can be utilized to describe both "in vivo" and "in vitro" systems. For example, and not limitation, in a screening approach, the endogenous or non-endogenous receptor may be

AREN-0309

PATENT

in reference to an in vitro screening system. As a further example and not limitation, where the genome of a mammal has been manipulated to include a non-endogenous constitutively activated receptor, screening of a candidate compound by means of an in vivo system is viable.

- 5 **G PROTEIN COUPLED RECEPTOR FUSION PROTEIN** and **GPCR FUSION PROTEIN**, in the context of the invention disclosed herein, each mean a non-endogenous protein comprising an endogenous, constitutively activate GPCR or a non-endogenous, constitutively activated GPCR fused to at least one G protein, most preferably the alpha (α) subunit of such G protein (this being the subunit that binds GTP), with the G
- 10 protein preferably being of the same type as the G protein that naturally couples with endogenous orphan GPCR. For example, and not limitation, in an endogenous state, if the G protein "G_s α " is the predominate G protein that couples with the GPCR, a GPCR Fusion Protein based upon the specific GPCR would be a non-endogenous protein comprising the GPCR fused to G_s α ; in some circumstances, as will be set forth below, a non-predominant
- 15 G protein can be fused to the GPCR. The G protein can be fused directly to the C-terminus of the constitutively active GPCR or there may be spacers between the two.

HOST CELL shall mean a cell capable of having a Plasmid and/or Vector incorporated therein. In the case of a prokaryotic Host Cell, a Plasmid is typically replicated as an autonomous molecule as the Host Cell replicates (generally, the Plasmid is

20 thereafter isolated for introduction into a eukaryotic Host Cell); in the case of a eukaryotic Host Cell, a Plasmid is integrated into the cellular DNA of the Host Cell such that when the eukaryotic Host Cell replicates, the Plasmid replicates. In some embodiments the Host Cell is eukaryotic, more preferably, mammalian, and most preferably selected from the group consisting of 293, 293T and COS-7 cells.

- 25 **INDIRECTLY IDENTIFYING** or **INDIRECTLY IDENTIFIED** means the traditional approach to the drug discovery process involving identification of an endogenous ligand specific for an endogenous receptor, screening of candidate compounds against the receptor for determination of those which interfere and/or compete with the ligand-receptor interaction, and assessing the efficacy of the compound for affecting at least one second
- 30 messenger pathway associated with the activated receptor.

AREN-0309

PATENT

INHIBIT or **INHIBITING**, in relationship to the term "response" shall mean that a response is decreased or prevented in the presence of a compound as opposed to in the absence of the compound.

INVERSE AGONISTS shall mean materials (*e.g.*, ligand, candidate compound) which bind to either the endogenous form of the receptor or to the constitutively activated form of the receptor, and which inhibit the baseline intracellular response initiated by the active form of the receptor below the normal base level of activity which is observed in the absence of agonists, or decrease GTP binding to membranes. Preferably, the baseline intracellular response is inhibited in the presence of the inverse agonist by at least 30%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 92%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, and most preferably at least 99% as compared with the baseline response in the absence of the inverse agonist.

KNOWN RECEPTOR shall mean an endogenous receptor for which the endogenous ligand specific for that receptor has been identified.

LIGAND shall mean a molecule specific for a naturally occurring receptor.

MUTANT or **MUTATION** in reference to an endogenous receptor's nucleic acid and/or amino acid sequence shall mean a specified change or changes to such endogenous sequences such that a mutated form of an endogenous, non-constitutively activated receptor evidences constitutive activation of the receptor. In terms of equivalents to specific sequences, a subsequent mutated form of a human receptor is considered to be equivalent to a first mutation of the human receptor if (a) the level of constitutive activation of the subsequent mutated form of a human receptor is substantially the same as that evidenced by the first mutation of the receptor; and (b) the percent sequence (amino acid and/or nucleic acid) homology between the subsequent mutated form of the receptor and the first mutation of the receptor is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 92%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, and most preferably at least 99%. In some embodiments, owing to the fact that some preferred cassettes disclosed herein for achieving constitutive activation include a single amino acid and/or codon change between the endogenous and the non-endogenous forms of the GPCR, it is preferred that the percent sequence homology should be at least 98%.

AREN-0309

PATENT

NON-ORPHAN RECEPTOR shall mean an endogenous naturally occurring molecule specific for an identified ligand wherein the binding of a ligand to a receptor activates an intracellular signaling pathway.

ORPHAN RECEPTOR shall mean an endogenous receptor for which the ligand
5 specific for that receptor has not been identified or is not known.

PHARMACEUTICAL COMPOSITION shall mean a composition comprising at least one active ingredient, whereby the composition is amenable to investigation for a specified, efficacious outcome in a mammal (for example, and not limitation, a human). Those of ordinary skill in the art will understand and appreciate the techniques appropriate
10 for determining whether an active ingredient has a desired efficacious outcome based upon the needs of the artisan.

PLASMID shall mean the combination of a Vector and cDNA. Generally, a Plasmid is introduced into a Host Cell for the purposes of replication and/or expression of the cDNA as a protein.

SECOND MESSENGER shall mean an intracellular response produced as a result
15 of receptor activation. A second messenger can include, for example, inositol triphosphate (IP₃), diacylglycerol (DAG), cyclic AMP (cAMP), and cyclic GMP (cGMP). Second messenger response can be measured for a determination of receptor activation. In addition, second messenger response can be measured for the direct identification of candidate
20 compounds, including for example, inverse agonists, agonists, and antagonists.

SIGNAL TO NOISE RATIO shall mean the signal generated in response to activation, amplification, or stimulation wherein the signal is above the background noise or the basal level in response to non-activation, non-amplification, or non-stimulation.

SPACER shall mean a translated number of amino acids that are located after the
25 last codon or last amino acid of a gene, for example a GPCR of interest, but before the start codon or beginning regions of the G protein of interest, wherein the translated number amino acids are placed in-frame with the beginnings regions of the G protein of interest. The number of translated amino acids can be tailored according to the needs of the skilled artisan and is generally from about one amino acid, preferably two amino acids, more
30 preferably three amino acids, more preferably four amino acids, more preferably five amino acids, more preferably six amino acids, more preferably seven amino acids, more preferably

AREN-0309**PATENT**

eight amino acids, more preferably nine amino acids, more preferably ten amino acids, more preferably eleven amino acids, and even more preferably twelve amino acids.

STIMULATE or **STIMULATING**, in relationship to the term "response" shall mean that a response is increased in the presence of a compound as opposed to in the
5 absence of the compound.

SUBSTANTIALLY shall refer to a result which is within 40% of a control result, preferably within 35%, more preferably within 30%, more preferably within 25%, more preferably within 20%, more preferably within 15%, more preferably within 10%, more preferably within 5%, more preferably within 2%, and most preferably within 1% of a
10 control result. For example, in the context of receptor functionality, a test receptor may exhibit substantially similar results to a control receptor if the transduced signal, measured using a method taught herein or similar method known to the art-skilled, is within 40% of the signal produced by a control signal.

VECTOR in reference to cDNA shall mean a circular DNA capable of
15 incorporating at least one cDNA and capable of incorporation into a Host Cell.

The order of the following sections is set forth for presentational efficiency and is not intended, nor should be construed, as a limitation on the disclosure or the claims to follow.

20 **A. Introduction**

The traditional study of receptors has typically proceeded from the *a priori* assumption (historically based) that the endogenous ligand must first be identified before discovery could proceed to find antagonists and other molecules that could affect the
25 receptor. Even in cases where an antagonist might have been known first, the search immediately extended to looking for the endogenous ligand. This mode of thinking has persisted in receptor research even after the discovery of constitutively activated receptors. What has not been heretofore recognized is that it is the active state of the receptor that is most useful for discovering agonists and inverse agonists of the receptor. For those diseases
30 which result from an overly active receptor or an under-active receptor, what is desired in a therapeutic drug is a compound which acts to diminish the active state of a receptor or enhance the activity of the receptor, respectively, not necessarily a drug which is an antagonist to the endogenous ligand. This is because a compound that reduces or enhances

AREN-0309**PATENT**

the activity of the active receptor state need not bind at the same site as the endogenous ligand. Thus, as taught by a method of this invention, any search for therapeutic compounds should start by screening compounds against the ligand-independent active state.

5 **B. Identification of Human GPCRs**

The efforts of the Human Genome project has led to the identification of a plethora of information regarding nucleic acid sequences located within the human genome; it has been the case in this endeavor that genetic sequence information has been made available without an understanding or recognition as to whether or not any particular genomic
 10 sequence does or may contain open-reading frame information that translate human proteins. Several methods of identifying nucleic acid sequences within the human genome are within the purview of those having ordinary skill in the art. For example, and not limitation, a variety of human GPCRs, disclosed herein, were discovered by reviewing the GenBank™ database. Table B, below, lists several endogenous GPCRs that we have
 15 discovered, along with other GPCRs that are homologous to the disclosed GPCR.

TABLE B

Disclosed Human Orphan GPCRs	Accession Number Identified	Open Reading Frame (Base Pairs)	Reference To Homologous GPCR	Per Cent Homology To Designated GPCR
hRUP28	AC073957	1,002bp	hGPR30	34%
hRUP29	AC083865	918bp	hGPR18	27%
hRUP30	AC055863	1,125bp	hBRB1	27%
hRUP31	AL356214	1,086bp	hGALR-1	31%
hRUP32	AL513524	1,038bp	hPNR	43%
hRUP33	AL513524	1,020bp	GPR57 GPR58	50% 51%
hRUP34	AL513524	1,029bp	hPNR	45%
hRUP35	AC021089	1,062bp	hc-type 3 opioid	27%
hRUP36	AC090099	969bp	GPR90	42%

AREN-0309

PATENT

hRUP37	AC090099	969bp	hMRG	41%
--------	----------	-------	------	-----

Receptor homology is useful in terms of gaining an appreciation of a role of the receptors within the human body. As the patent document progresses, techniques for mutating these receptors to establish non-endogenous, constitutively activated versions of these receptors will be discussed.

The techniques disclosed herein are also applicable to other human GPCRs known to the art, as will be apparent to those skilled in the art.

C. Receptor Screening

Screening candidate compounds against a non-endogenous, constitutively activated version of the GPCRs disclosed herein allows for the direct identification of candidate compounds which act at the cell surface receptor, without requiring use of the receptor's endogenous ligand. Using routine, and often commercially available techniques, one can determine areas within the body where the endogenous version of human GPCRs disclosed herein is expressed and/or over-expressed. The expression location of a receptor in a specific tissue provides a scientist with the ability to assign a physiological functional role of the receptor. It is also possible using these techniques to determine related disease/disorder states which are associated with the expression and/or over-expression of the receptor; such an approach is disclosed in this patent document. Furthermore, expression of a receptor in diseased organs can assist one in determining the magnitude of the clinical relevance of the receptor.

Constitutive activation of the GPCRs disclosed herein is based upon the distance from the proline residue at which is presumed to be located within TM6 of the GPCR; this algorithmic technique is disclosed in co-pending and commonly assigned patent document PCT Application Number PCT/US99/23938, published as WO 00/22129 on April 20, 2000, which, along with the other patent documents listed herein, is incorporated herein by reference. The algorithmic technique is not predicated upon traditional sequence "alignment" but rather a specified distance from the aforementioned TM6 proline residue (or, of course, endogenous constitutive substitution for such proline residue). By mutating the amino acid residue located 16 amino acid residues from this residue (presumably located in the IC3 region of the receptor) to, most preferably, a lysine residue, constitutive

AREN-0309

PATENT

activation of the receptor may be obtained. Other amino acid residues may be useful in the mutation at this position to achieve this objective and will be discussed in detail, below.

D. Disease/Disorder Identification and/or Selection

As will be set forth in greater detail below, inverse agonists and agonists to the non-
5 endogenous, constitutively activated GPCR can be identified by the methodologies of this invention. Such inverse agonists and agonists are ideal candidates as lead compounds in drug discovery programs for treating diseases related to this receptor. Because of the ability to directly identify inverse agonists to the GPCR, thereby allowing for the development of pharmaceutical compositions, a search for diseases and disorders associated with the GPCR
10 is relevant. The expression location of a receptor in a specific tissue provides a scientist with the ability to assign a physiological function to the receptor. For example, scanning both diseased and normal tissue samples for the presence of the GPCR now becomes more than an academic exercise or one which might be pursued along the path of identifying an endogenous ligand to the specific GPCR. Tissue scans can be conducted across a broad
15 range of healthy and diseased tissues. Such tissue scans provide a potential first step in associating a specific receptor with a disease and/or disorder. Furthermore, expression of a receptor in diseased organs can assist one in determining the magnitude of clinical relevance of the receptor.

The DNA sequence of the GPCR can be used to make a probe/primer. In some
20 preferred embodiments the DNA sequence is used to make a probe for (a) dot-blot analysis against tissue-mRNA, and/or (b) RT-PCR identification of the expression of the receptor in tissue samples. The presence of a receptor in a tissue source, or a diseased tissue, or the presence of the receptor at elevated concentrations in diseased tissue compared to a normal tissue, can be used to correlate location to function and indicate the receptor's physiological
25 role/function and create a treatment regimen, including but not limited to, a disease associated with that function/role. Receptors can also be localized to regions of organs by this technique. Based on the known or assumed roles/functions of the specific tissues to which the receptor is localized, the putative physiological function of the receptor can be deduced. For example and not limitation, proteins located/expressed in areas of the
30 thalamus are associated with sensorimotor processing and arousal (*see*, Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Edition, page 465 (1996)). Proteins expressed in the hippocampus or in Schwann cells are associated with learning and

AREN-0309

PATENT

memory, and myelination of peripheral nerves, respectively (*see*, Kandel, E. et al., Essentials of Neural Science and Behavior pages 657, 680 and 28, respectively (1995)).

E. Screening of Candidate Compounds

5 1. Generic GPCR screening assay techniques

When a G protein receptor becomes constitutively active, it binds to a G protein (*e.g.*, G_q , G_s , G_i , G_o) and stimulates the binding of GTP to the G protein. The G protein then acts as a GTPase and hydrolyzes the GTP to GDP, whereby the receptor, under normal conditions, becomes deactivated. However, constitutively activated receptors continue to
 10 exchange GDP to GTP. A non-hydrolyzable analog of GTP, [35 S]GTP γ S, can be used to monitor enhanced binding to membranes which express constitutively activated receptors. It is reported that [35 S]GTP γ S can be used to monitor G protein coupling to membranes in the absence and presence of ligand. An example of this monitoring, among other examples well-known and available to those in the art, was reported by Traynor and Nahorski in
 15 1995. The use of this assay system is typically for initial screening of candidate compounds because the system is generically applicable to all G protein-coupled receptors regardless of the particular G protein that interacts with the intracellular domain of the receptor.

2. Specific GPCR screening assay techniques

Once candidate compounds are identified using the "generic" G protein-coupled
 20 receptor assay (*i.e.*, an assay to select compounds that are agonists or inverse agonists), further screening to confirm that the compounds have interacted at the receptor site is preferred. For example, a compound identified by the "generic" assay may not bind to the receptor, but may instead merely "uncouple" the G protein from the intracellular domain.

a. G_s , G_i and G_o

G_s stimulates the enzyme adenylyl cyclase. G_i (and G_o and G_o), on the other hand,
 25 inhibits adenylyl cyclase. Adenylyl cyclase catalyzes the conversion of ATP to cAMP; thus, constitutively activated GPCRs that couple the G_s protein are associated with increased cellular levels of cAMP. On the other hand, constitutively activated GPCRs that couple G_i (or G_o , G_o) protein are associated with decreased cellular levels of cAMP. *See*,
 30 *generally*, "Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission," Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J.G. et al eds. Sinauer Associates, Inc. (1992). Thus, assays that detect cAMP can be utilized to determine if a candidate compound is, *e.g.*, an inverse

AREN-0309

PATENT

agonist to the receptor (*i.e.*, such a compound would decrease the levels of cAMP). A variety of approaches known in the art for measuring cAMP can be utilized; a most preferred approach relies upon the use of anti-cAMP antibodies in an ELISA-based format. Another type of assay that can be utilized is a whole cell second messenger reporter system assay. Promoters on genes drive the expression of the proteins that a particular gene encodes. Cyclic AMP drives gene expression by promoting the binding of a cAMP-responsive DNA binding protein or transcription factor (CREB) that then binds to the promoter at specific sites (cAMP response elements) and drives the expression of the gene. Reporter systems can be constructed which have a promoter containing multiple cAMP response elements before the reporter gene, *e.g.*, β -galactosidase or luciferase. Thus, a constitutively activated G_i -linked receptor causes the accumulation of cAMP that then activates the gene and leads to the expression of the reporter protein. The reporter protein such as β -galactosidase or luciferase can then be detected using standard biochemical assays (Chen et al. 1995).

15 *b. G_o and G_q*

G_q and G_o are associated with activation of the enzyme phospholipase C, which in turn hydrolyzes the phospholipid PIP_2 , releasing two intracellular messengers: diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). Increased accumulation of IP_3 is associated with activation of G_q - and G_o -associated receptors. *See, generally*, "Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission," Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J.G. et al eds. Sinauer Associates, Inc. (1992). Assays that detect IP_3 accumulation can be utilized to determine if a candidate compound is, *e.g.*, an inverse agonist to a G_q - or G_o -associated receptor (*i.e.*, such a compound would decrease the levels of IP_3). G_q -associated receptors can also be examined using an AP1 reporter assay wherein G_q -dependent phospholipase C causes activation of genes containing AP1 elements; thus, activated G_q -associated receptors will evidence an increase in the expression of such genes, whereby inverse agonists thereto will evidence a decrease in such expression, and agonists will evidence an increase in such expression. Commercially available assays for such detection are available.

3. GPCR Fusion Protein

AREN-0309

PATENT

The use of an endogenous, constitutively activated GPCR or a non-endogenous, constitutively activated GPCR, for use in screening of candidate compounds for the direct identification of inverse agonists, agonists provide an interesting screening challenge in that, by definition, the receptor is active even in the absence of an endogenous ligand bound thereto. Thus, in order to differentiate between, *e.g.*, the non-endogenous receptor in the presence of a candidate compound and the non-endogenous receptor in the absence of that compound, with an aim of such a differentiation to allow for an understanding as to whether such compound may be an inverse agonist or agonist or have no affect on such a receptor, it is preferred that an approach be utilized that can enhance such differentiation. A preferred approach is the use of a GPCR Fusion Protein.

Generally, once it is determined that a non-endogenous GPCR has been constitutively activated using the assay techniques set forth above (as well as others), it is possible to determine the predominant G protein that couples with the endogenous GPCR. Coupling of the G protein to the GPCR provides a signaling pathway that can be assessed. In some embodiments it is preferred that screening take place using a mammalian expression system, such a system will be expected to have endogenous G protein therein. Thus, by definition, in such a system, the non-endogenous, constitutively activated GPCR will continuously signal. In some embodiments it is preferred that this signal be enhanced such that in the presence of, *e.g.*, an inverse agonist to the receptor, it is more likely that it will be able to more readily differentiate, particularly in the context of screening, between the receptor when it is contacted with the inverse agonist.

The GPCR Fusion Protein is intended to enhance the efficacy of G protein coupling with the non-endogenous GPCR. The GPCR Fusion Protein is preferred for screening with either an endogenous, constitutively active GPCR or a non-endogenous, constitutively activated GPCR because such an approach increases the signal that is utilized in such screening techniques. This is important in facilitating a significant "signal to noise" ratio; such a significant ratio is preferred for the screening of candidate compounds as disclosed herein.

The construction of a construct useful for expression of a GPCR Fusion Protein is within the purview of those having ordinary skill in the art. Commercially available expression vectors and systems offer a variety of approaches that can fit the particular needs of an investigator. Important criteria on the construction of such a GPCR Fusion Protein

AREN-0309

PATENT

construct include but are not limited to, that the endogenous GPCR sequence and the G protein sequence both be in-frame (preferably, the sequence for the endogenous GPCR is upstream of the G protein sequence), and that the "stop" codon of the GPCR be deleted or replaced such that upon expression of the GPCR, the G protein can also be expressed.

- 5 Other embodiments include constructs wherein the endogenous GPCR sequence and the G protein sequence are not in-frame and/or the "stop" codon is not deleted or replaced. The GPCR can be linked directly to the G protein, or there can be spacer residues between the two (preferably, no more than about 12, although this number can be readily ascertained by one of ordinary skill in the art). Based upon convenience it is preferred to use a spacer.
- 10 Preferably, the G protein that couples to the non-endogenous GPCR will have been identified prior to the creation of the GPCR Fusion Protein construct. Because there are only a few G proteins that have been identified, it is preferred that a construct comprising the sequence of the G protein (*i.e.*, a universal G protein construct (see *Examples*)) be available for insertion of an endogenous GPCR sequence therein; this provides for further
- 15 efficiency in the context of large-scale screening of a variety of different endogenous GPCRs having different sequences.

- As noted above, constitutively activated GPCRs that couple to G_i , G_z and G_o are expected to inhibit the formation of cAMP making assays based upon these types of GPCRs challenging (*i.e.*, the cAMP signal decreases upon activation thus making the direct
- 20 identification of, *e.g.*, inverse agonists (which would further decrease this signal), challenging. As will be disclosed herein, we have ascertained that for these types of receptors, it is possible to create a GPCR Fusion Protein that is not based upon the GPCRs endogenous G protein, in an effort to establish a viable cyclase-based assay. Thus, for example, an endogenous G_i coupled receptor can be fused to a G_s protein—such a fusion
- 25 construct, upon expression, "drives" or "forces" the endogenous GPCR to couple with, *e.g.*, G_s rather than the "natural" G_i protein, such that a cyclase-based assay can be established. Thus, for G_i , G_z and G_o coupled receptors, in some embodiments it is preferred that when a GPCR Fusion Protein is used and the assay is based upon detection of adenylyl cyclase activity, that the fusion construct be established with G_s (or an equivalent G protein that
- 30 stimulates the formation of the enzyme adenylyl cyclase).

G	Effect of cAMP	Effect of IP_3	Effect of	Effect on IP_3
---	----------------	------------------	-----------	------------------

AREN-0309

PATENT

protein	Production upon Activation of GPCR (<i>i.e.</i> , constitutive activation or agonist binding)	Accumulation upon Activation of GPCR (<i>i.e.</i> , constitutive activation or agonist binding)	cAMP Production upon contact with an Inverse Agonist	Accumulation upon contact with an Inverse Agonist
G _s	Increase	N/A	Decrease	N/A
G _i	Decrease	N/A	Increase	N/A
G _o	Decrease	N/A	Increase	N/A
G _q	Decrease	Increase	Increase	Decrease
G ₁₂	N/A	Increase	N/A	Decrease

Equally effective is a G Protein Fusion construct that utilizes a G_q Protein fused with a G_s, G_i, G_o or G₁₂ Protein. In some embodiments a preferred fusion construct can be accomplished with a G_q Protein wherein the first six (6) amino acids of the G-protein α -subunit ("G α q") is deleted and the last five (5) amino acids at the C-terminal end of G α q is replaced with the corresponding amino acids of the G α of the G protein of interest. For example, a fusion construct can have a G_q (6 amino acid deletion) fused with a G_i Protein, resulting in a "G_q/G_i Fusion Construct". This fusion construct will force the endogenous G_i coupled receptor to couple to its non-endogenous G protein, G_q, such that the second messenger, for example, inositol triphosphate or diacylglycerol, can be measured *in lieu* of cAMP production.

4. Co-transfection of a Target G_i Coupled GPCR with a Signal-Enhancer G_s Coupled GPCR (cAMP Based Assays)

A G_i coupled receptor is known to inhibit adenylyl cyclase, and, therefore, decreases the level of cAMP production, which can make assessment of cAMP levels challenging. An effective technique in measuring the decrease in production of cAMP as an indication of constitutive activation of a receptor that predominantly couples G_i upon activation can be accomplished by co-transfecting a signal enhancer, *e.g.*, a non-endogenous, constitutively activated receptor that predominantly couples with G_s upon activation (*e.g.*, TSHR-A623I, disclosed below), with the G_i linked GPCR. As is apparent, constitutive activation of a G_s

AREN-0309**PATENT**

coupled receptor can be determined based upon an increase in production of cAMP. Constitutive activation of a G_i coupled receptor leads to a decrease in production cAMP. Thus, the co-transfection approach is intended to advantageously exploit these "opposite" affects. For example, co-transfection of a non-endogenous, constitutively activated G_s coupled receptor (the "signal enhancer") with the endogenous G_i coupled receptor (the "target receptor") provides a baseline cAMP signal (*i.e.*, although the G_i coupled receptor will decrease cAMP levels, this "decrease" will be relative to the substantial increase in cAMP levels established by constitutively activated G_s coupled signal enhancer). By then co-transfecting the signal enhancer with a constitutively activated version of the target receptor, cAMP would be expected to further decrease (relative to base line) due to the increased functional activity of the G_i target (*i.e.*, which decreases cAMP).

Screening of candidate compounds using a cAMP based assay can then be accomplished, with two 'changes' relative to the use of the endogenous receptor/G-protein fusion: first, relative to the G_i coupled target receptor, "opposite" effects will result, *i.e.*, an inverse agonist of the G_i coupled target receptor will increase the measured cAMP signal, while an agonist of the G_i coupled target receptor will decrease this signal; second, as would be apparent, candidate compounds that are directly identified using this approach should be assessed independently to ensure that these do not target the signal enhancing receptor (this can be done prior to or after screening against the co-transfected receptors).

F. Medicinal Chemistry

Generally, but not always, direct identification of candidate compounds is conducted in conjunction with compounds generated via combinatorial chemistry techniques, whereby thousands of compounds are randomly prepared for such analysis. Generally, the results of such screening will be compounds having unique core structures; thereafter, these compounds may be subjected to additional chemical modification around a preferred core structure(s) to further enhance the medicinal properties thereof. Such techniques are known to those in the art and will not be addressed in detail in this patent document.

G. Pharmaceutical compositions

AREN-0309

PATENT

Candidate compounds selected for further development can be formulated into pharmaceutical compositions using techniques well known to those in the art. Suitable pharmaceutically-acceptable carriers are available to those in the art; for example, see Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980, Mack Publishing Co., (Osol et al., eds.).

H. Other Utilities

Although a preferred use of the non-endogenous versions of the GPCRs disclosed herein may be for the direct identification of candidate compounds as inverse agonists or agonists (preferably for use as pharmaceutical agents), other uses of these versions of GPCRs exist. For example, *in vitro* and *in vivo* systems incorporating GPCRs can be utilized to further elucidate and understand the roles these receptors play in the human condition, both normal and diseased, as well as understanding the role of constitutive activation as it applies to understanding the signaling cascade. In some embodiments it is preferred that the endogenous receptors be "orphan receptors", *i.e.*, the endogenous ligand for the receptor has not been identified. In some embodiments, therefore, the modified, non-endogenous GPCRs can be used to understand the role of endogenous receptors in the human body before the endogenous ligand therefore is identified. Such receptors can also be used to further elucidate known receptors and the pathways through which they transduce a signal. Other uses of the disclosed receptors will become apparent to those in the art based upon, *inter alia*, a review of this patent document.

EXAMPLES

The following examples are presented for purposes of elucidation, and not limitation, of the present invention. While specific nucleic acid and amino acid sequences are disclosed herein, those of ordinary skill in the art are credited with the ability to make minor modifications to these sequences while achieving the same or substantially similar results reported below. The traditional approach to application or understanding of sequence cassettes from one sequence to another (*e.g.* from rat receptor to human receptor or from human receptor A to human receptor B) is generally predicated upon sequence alignment techniques whereby the sequences are aligned in an effort to determine areas of commonality. The mutational approach disclosed herein does not rely upon this approach but is instead based upon an algorithmic approach and a positional distance from a conserved proline residue located within the TM6 region of human GPCRs. Once this

AREN-0309

PATENT

approach is secured, those in the art are credited with the ability to make minor modifications thereto to achieve substantially the same results (*i.e.*, constitutive activation) disclosed herein. Such modified approaches are considered within the purview of this disclosure.

5 **Example 1****ENDOGENOUS HUMAN GPCRS****1. Identification of Human GPCRs**

The disclosed endogenous human GPCRs were identified based upon a review of the GenBank™ database information. While searching the database, the following

10 cDNA clones were identified as evidenced below (Table C).

TABLE C

Disclosed Human Orphan GPCRs	Accession Number Identified	Open Reading Frame (Base Pairs)	Reference To Homologous GPCR	Nucleic Acid SEQ.ID. NO.	Amino Acid SEQ.ID.NO.
hRUP28	AC073957	1,002bp	hGPR30	1	2
hRUP29	AC083865	918bp	hGPR18	3	4
hRUP30	AC055863	1,125bp	hBRB1	5	6
hRUP31	AL356214	1,086bp	hGALR-1	7	8
hRUP32	AL513524	1,038bp	hPNR	9	10
hRUP33	AL513524	1,020bp	GPR57 GPR58	11	12
hRUP34	AL513524	1,029bp	hPNR	13	14
hRUP35	AC021089	1,062bp	hκ-type 3 opioid	15	16
hRUP36	AC090099	969bp	GPR90	17	18
hRUP37	AC090099	969bp	hMRG	19	20

2. Full Length Cloning**a. hRUP28 (Seq. Id. Nos. 1 & 2)**

15 The disclosed human RUP28 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC073957 was identified as a human genomic sequence from chromosome 7.

The full length RUP28 was cloned by PCR using primers:

AREN-0309**PATENT**

5'- CAGAGCTCTGGTGGCCACCTCTGTCC-

3' (SEQ.ID.NO.:21; sense, 5' of initiation codon),

5'-CTGCGTCCACCAGAGTCACGTCTCC-3' (SEQ.ID.NO.:22; antisense, 3' of stop codon), and human adult liver Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template.

- 5 Advantage™ cDNA polymerase (Clontech) was used for the amplification in a 50μl reaction by the following cycle with step 2 to 4 repeated 35 times: 95°C for 5 min; 94°C for 30 sec; 58°C for 30 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

- A 1.16kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:1 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:2 for the putative amino acid sequence.

b. hRUP29 (Seq. Id. Nos. 3 & 4)

- The disclosed human RUP29 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC0083865 was identified as a human genomic sequence from chromosome 7.

The full length RUP29 was cloned by PCR using primers:

5'-GTATGCCTGGCCACAATACCTCCAGG-3' (SEQ.ID.NO.:23; sense, containing the initiation codon),

- 5'-GTTTGTGGCTAACGGCACAAACACAATTCC-3' (SEQ.ID.NO.:24; antisense, containing the stop codon) and human genomic DNA as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification in a 50μl reaction by the following cycle with step 2 to 4 repeated 35 times: 94°C for 5 min; 94°C for 30 sec; 54°C for 30 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

- A 930bp PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems).

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was performed using human leukocyte and ovary Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) to determine the precise 5' end of RUP29 cDNA. RUP29 specific primer (1) having the sequence:

- 30 5-GGTACCACAATGACAATCACCAGCGTCC-3'(SEQ.ID.NO.:25) and AP1 primer (Clontech) were used for the first-round PCR reaction, and RUP29 specific primer (2) having the following sequence:

AREN-0309

PATENT

5'-

GGAACGTGAGGTACATGTGGATGTGCAGC-3' (SEQ.ID.NO.:26)

and AP2 primer (Clontech) were used for the second-round PCR reaction. The products of the RACE reactions were isolated and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. See, SEQ.ID.NO.:3 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:4 for the putative amino acid sequence.

c. hRUP30 (Seq. Id. Nos. 5 & 6)

The disclosed human RUP30 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC055863 was identified as a human genomic sequence from chromosome 17.

The full length RUP30 was cloned by 5'RACE-PCR with a human pancreas Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template and the following oligonucleotide: 5'-GCAGTGTAGCGGTCAACCGTGAGCAGG-3' (SEQ.ID.NO.:27; sense, containing the initiation codon), and AP1 primer (Clontech) were used for the first round of RT-PCR and oligonucleotide:

5'-TGAGCAGGATGGCGATCCAGACTGAGGCGTGG-3' (SEQ.ID.NO.:28; antisense, containing the stop codon) and AP2 primer (Clontech) were used for the second round of PCR. DNA fragments generated by the 5' RACE-PCR were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the SP6/T7 primers (Stratagene).

Based on the sequence of the 5' RACE products, the full length RUP30 was cloned by RT-PCR, using primers:

5'-GAGGTACAGCTGGCGATGCTGACAG-3' (SEQ.ID.NO.:29; sense, ATG as the initiation codon);

5'-GTGGCCATGAGCCACCCTGAGCTCC-3' (SEQ.ID.NO.:30; antisense, 3' of the stop codon) and human pancreas Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template. Taq DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification in 50 µl reaction by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 94°C for 40 seconds; 94°C for 20 seconds; 64°C for 20 seconds; 72°C for 2 minutes; and 72°C for 5 minutes.

A 1.2 Kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and several clones were sequenced using the ABI Big Dye Terminator kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:5 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:6 for the putative amino acid sequence.

AREN-0309

PATENT

d. hRUP31 (Seq. Id. Nos. 7 & 8)

The disclosed human RUP31 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AL356214 was identified as a human genomic sequence from chromosome 10.

5 The full length RUP31 was cloned by RT-PCR using primers:

5'-GGAATGTCCACTGAATGCGCGCGG-3' (SEQ.ID.NO.:31; sense, containing the initiation codon),

5'-AGCTCGCCAGGTGTGAGAACTCGG-3' (SEQ.ID.NO.:32; antisense, 3' of stop codon) and human mammary gland Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template.

10 Advantage™ cDNA polymerase (Clontech) was used for the amplification in 50 µl reaction by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 94°C for 40 sec; 94°C for 20 sec; 66°C for 20 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 5 min.

A 1.1 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit
15 (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:7 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:8 for the putative amino acid sequence.

e. hRUP32 (Seq. Id. Nos. 9 & 10)

The disclosed human RUP32 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession
20 Number AL513524 was identified as a human genomic sequence from chromosome 6.

The full length RUP32 was cloned by PCR using primers:

5'-GCGTTATGAGCAGCAATTCATCCCTGCTGG-3' (SEQ.ID.NO.:33; sense, containing the initiation codon),

5'-GTATCCTGAACTTCGCTATACAACCTGC-3' (SEQ.ID.NO.:34; antisense)

25 and human genomic DNA (Clontech) as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 94°C for 3 min; 94°C for 20 sec; 58°C for 20 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

A 1.06 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the
30 pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:9 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:10 for the putative amino acid sequence.

AREN-0309

PATENT

f. hRUP33 (Seq. Id. Nos. 11 & 12)

The disclosed human RUP33 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AL513524 was identified as a human genomic sequence from chromosome 6.

5 The full length RUP33 was cloned by PCR using primers:

5'-CCCTCAGGAATGATGCCCTTTGCCACAA-3' (SEQ.ID.NO.:35; sense, containing the initiation codon),

5'-ATCCATGTGGTGGTGCATGTGGTTCGT-3' (SEQ.ID.NO.:36; antisense)

10 and human genomic DNA (Clontech) as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 94°C for 3 min; 94°C for 20 sec; 56°C for 20 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

A 1.1 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit
15 (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:11 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:12 for the putative amino acid sequence.

g. hRUP34 (Seq. Id. Nos. 13 & 14)

The disclosed human RUP34 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession
20 Number AL513524 was identified as a human genomic sequence from chromosome 6.

The full length RUP34 was cloned by PCR using primers:

5'-AAACAACAAACAGCAGAACCATGACCAGC-3' (SEQ.ID.NO.:37; sense, containing the initiation codon),

5'-ACATAGAGACAAGTGACATGTGTGAACCAC-3' (SEQ.ID.NO.:38; antisense)

25 and human genomic DNA (Clontech) as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 94°C for 3 min; 94°C for 20 sec; 60°C for 20 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

A 1.27 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the
30 pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:13 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:14 for the putative amino acid sequence.

AREN-0309

PATENT

h. hRUP35 (Seq. Id. Nos. 15 & 16)

The disclosed human RUP35 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC021089 was identified as a human genomic sequence from chromosome 16.

5 The 5' sequence of RUP35 was determined by 5' RACE-PCR with a human fetal brain Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template. Oligonucleotide 5'-GGTATGAGACCGTGTGGTACTTGAGC-3' (SEQ.ID.NO.:39; sense) and AP1 primer (Clontech) were used for the first round of RT-PCR and oligonucleotide 5'-GTGGCAGACAGCGATATACCTGTCAATGG-3' (SEQ.ID.NO.:40; antisense) 10 and AP2 primer (Clontech) were used for the second round of PCR. DNA fragments generated by the 5' RACE-PCR were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the SP6/T7 primers (Stratagene).

Based upon the sequence of the 5' RACE products, the full length RUP35 was cloned by RT-PCR, using primers

15 5'-GCGCTCATGGAGCACACGCACGCCAC-3' (SEQ.ID.NO.:41; sense, ATG as the initiation codon) and

5'-GAGGCAGTAGTTGCCACACCTATGG-3' (SEQ.ID.NO.:42; antisense, 3' of the stop codon) and human brain Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) as template. Advantage™ cDNA polymerase (Clontech) was used for the amplification in 100 µl reaction by the 20 following cycle with step 2 to step 4 repeated 45 times: 95°C for 2 min; 95°C for 20 sec; 60°C for 20 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 5 min.

A 1.0 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:15 for the nucleic acid sequence and

25 SEQ.ID.NO.:16 for the putative amino acid sequence.

i. hRUP36 (Seq. Id. Nos. 17 & 18)

The disclosed human RUP36 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC090099 was identified as a human genomic sequence from chromosome 11.

30 The full length RUP36 was cloned by PCR using primers:

5'-CATCTGGTTTGTGTTCCAGGGGCACCAG-3' (SEQ.ID.NO.:43; sense, 5' of start codon),

AREN-0309**PATENT**

5'

GACAGTGTGCTCTCAAAGTCCCGTCTGACTG -3' (SEQ.ID.NO.:44; antisense, 3' of stop codon) and human genomic DNA (Clontech) as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification in a 50µl reaction by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 30 times: 95°C, 5 min; 95°C for 30 sec; 70°C for 30 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

A 1.0 kb PCR fragment was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:17 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:18 for the putative amino acid sequence.

j. hRUP37 (Seq. Id. Nos. 19 & 20)

The disclosed human RUP37 was identified based upon the use of GenBank database information. While searching the database, a cDNA clone with Accession Number AC090099 was identified as a human genomic sequence from chromosome 11.

The full length RUP37 was cloned by PCR using primers:

5'-CTGTTTCCAGGGTCATCAGACTGGG-3' (SEQ.ID.NO.:45; sense);

5'-GCAGCATTGCTCTCAAAGTCCTGTCTG-3' (SEQ.ID.NO.:46; antisense)

and human genomic DNA (Clontech) as template. TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was used for the amplification by the following cycle with step 2 to step 4 repeated 35 times: 95°C for 5 min; 95°C for 30 sec; 62°C for 30 sec; 72°C for 1 min 30 sec; and 72°C for 7 min.

A 969 base pair was isolated from a 1% agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator Kit (P.E. Biosystems). See, SEQ.ID.NO.:19 for the nucleic acid sequence and SEQ.ID.NO.:20 for the putative amino acid sequence.

Example 2**PREPARATION OF NON-ENDOGENOUS, CONSTITUTIVELY ACTIVATED GPCRS**

Those skilled in the art are credited with the ability to select techniques for mutation of a nucleic acid sequence. Presented below are approaches utilized to create non-endogenous versions of several of the human GPCRs disclosed above. The mutations disclosed below are based upon an algorithmic approach whereby the 16th amino acid (located in the IC3 region of the GPCR) from a conserved proline (or an

AREN-0309 **PATENT**
 endogenous, conservative substitution therefore) residue (located in the TM6
 region of the GPCR, near the TM6/IC3 interface) is mutated, preferably to an alanine,
 histidine, arginine or lysine amino acid residue, most preferably to a lysine amino acid
 residue.

5 **1. Transformer Site-Directed™ Mutagenesis**

Preparation of non-endogenous human GPCRs may be accomplished on human
 GPCRs using, *inter alia*, Transformer Site-Directed™ Mutagenesis Kit (Clontech)
 according to the manufacturer instructions. In some embodiments two mutagenesis primers
 are used, preferably a lysine mutagenesis oligonucleotide that creates the lysine mutation,
 10 and a selection marker oligonucleotide. For convenience, the codon mutation to be
 incorporated into the human GPCR is also noted, in standard form (Table D):

TABLE D

Receptor Identifier	Codon Mutation
hRUP28	V274K
hRUP29	T249K
hRUP30	R232K
hRUP31	M294K
hRUP32	F220K
hRUP34	A238K
hRUP35	Y215K
hRUP36	L294K
hRUP37	T219K

15 **Example 3**

RECEPTOR EXPRESSION

Although a variety of cells are available to the art-skilled for the expression of
 proteins, it is preferred that mammalian cells be utilized. The primary reason for this is
 20 predicated upon practicalities, *i.e.*, utilization of, *e.g.*, yeast cells for the expression of a
 GPCR, while possible, introduces into the protocol a non-mammalian cell which may not
 (indeed, in the case of yeast, does not) include the receptor-coupling, genetic-mechanism

AREN-0309**PATENT**

and secretory pathways that have evolved for mammalian systems -- thus, results obtained in non-mammalian cells, while of potential use, are not as preferred as those obtained using mammalian cells. Of the mammalian cells, COS-7, 293 and 293T cells are particularly preferred, although the specific mammalian cell utilized can be predicated upon the particular needs of the artisan.

a. Transient Transfection

On day one, 6×10^6 cells/10 cm dish of 293 cells well were plated out. On day two, two reaction tubes were prepared (the proportions to follow for each tube are per plate): tube A was prepared by mixing 4 μ g DNA (e.g., pCMV vector; pCMV vector with receptor cDNA, etc.) in 0.5 ml serum free DMEM (Gibco BRL); tube B was prepared by mixing 24 μ l lipofectamine (Gibco BRL) in 0.5ml serum free DMEM. Tubes A and B were admixed by inversion (several times), followed by incubation at room temperature for 30-45min. The admixture is referred to as the "transfection mixture". Plated 293 cells were washed with 1XPBS, followed by addition of 5 ml serum free DMEM. One ml of the transfection mixture were added to the cells, followed by incubation for 4hrs at 37°C/5% CO₂. The transfection mixture was removed by aspiration, followed by the addition of 10ml of DMEM/10% Fetal Bovine Serum. Cells were incubated at 37°C/5% CO₂. After 48hr incubation, cells were harvested and utilized for analysis.

b. Stable Cell Lines

Approximately 12×10^6 293 cells will be plated on a 15cm tissue culture plate, and grown in DME High Glucose Medium containing 10% fetal bovine serum and one percent sodium pyruvate, L-glutamine, and antibiotics. Twenty-four hours following plating of 293 cells (to approximately ~80% confluency), the cells will be transfected using 12 μ g of DNA. The 12 μ g of DNA is combined with 60 μ l of lipofectamine and 2mL of DME High Glucose Medium without serum. The medium will be aspirated from the plates and the cells washed once with medium without serum. The DNA, lipofectamine, and medium mixture will be added to the plate along with 10mL of medium without serum. Following incubation at 37°C for four to five hours, the medium will be aspirated and 25ml of medium containing serum will be added. Twenty-four hours following transfection, the medium will be aspirated again, and fresh medium with serum will be added. Forty-eight hours following transfection, the medium will be aspirated and medium with serum will be added containing geneticin (G418 drug) at a final concentration of 500 μ g/mL. The transfected cells will then

AREN-0309**PATENT**

undergo selection for positively transfected cells containing the G418 resistant gene. The medium will be replaced every four to five days as selection occurs. During selection, cells will be grown to create stable pools, or split for stable clonal selection.

Example 4

5 **ASSAYS FOR DETERMINATION OF CONSTITUTIVE ACTIVITY**
OF NON-ENDOGENOUS GPCRS

A variety of approaches are available for assessment of constitutive activity of the non-endogenous human GPCRs. The following are illustrative; those of ordinary skill in
10 the art are credited with the ability to determine those techniques that are preferentially beneficial for the needs of the artisan.

1. **Membrane Binding Assays: [³⁵S]GTPγS Assay**

When a G protein-coupled receptor is in its active state, either as a result of ligand
15 binding or constitutive activation, the receptor couples to a G protein and stimulates the release of GDP and subsequent binding of GTP to the G protein. The alpha subunit of the G protein-receptor complex acts as a GTPase and slowly hydrolyzes the GTP to GDP, at which point the receptor normally is deactivated. Constitutively activated receptors continue to exchange GDP for GTP. The non-hydrolyzable GTP analog, [³⁵S]GTPγS, can
20 be utilized to demonstrate enhanced binding of [³⁵S]GTPγS to membranes expressing constitutively activated receptors. Advantages of using [³⁵S]GTPγS binding to measure constitutive activation include but are not limited to the following: (a) it is generically applicable to all G protein-coupled receptors; (b) it is proximal at the membrane surface making it less likely to pick-up molecules which affect the intracellular cascade.

25 The assay takes advantage of the ability of G protein coupled receptors to stimulate [³⁵S]GTPγS binding to membranes expressing the relevant receptors. The assay can, therefore, be used in the direct identification method to screen candidate compounds to constitutively activated G protein-coupled receptors. The assay is generic and has application to drug discovery at all G protein-coupled receptors.

30 The [³⁵S]GTPγS assay is incubated in 20 mM HEPES and between 1 and about 20mM MgCl₂ (this amount can be adjusted for optimization of results, although 20mM is preferred) pH 7.4, binding buffer with between about 0.3 and about 1.2 nM [³⁵S]GTPγS

AREN-0309**PATENT**

(this amount can be adjusted for optimization of results, although 1.2 is preferred) and 12.5 to 75 µg membrane protein (e.g., 293 cells expressing the G_s Fusion Protein; this amount can be adjusted for optimization) and 10 µM GDP (this amount can be changed for optimization) for 1 hour. Wheatgerm agglutinin beads (25 µl; Amersham) will then be added and the mixture incubated for another 30 minutes at room temperature. The tubes will be then centrifuged at 1500 x g for 5 minutes at room temperature and then counted in a scintillation counter.

2. Adenylyl Cyclase

A Flash Plate™ Adenylyl Cyclase kit (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A) designed for cell-based assays can be modified for use with crude plasma membranes. The Flash Plate wells can contain a scintillant coating which also contains a specific antibody recognizing cAMP. The cAMP generated in the wells can be quantitated by a direct competition for binding of radioactive cAMP tracer to the cAMP antibody. The following serves as a brief protocol for the measurement of changes in cAMP levels in whole cells that express the receptors.

Transfected cells will be harvested approximately twenty four hours after transient transfection. Media will be carefully aspirated and discarded. Ten ml of PBS will gently be added to each dish of cells followed by careful aspiration. One ml of Sigma cell dissociation buffer and 3ml of PBS will be added to each plate. Cells will be pipetted off the plate and the cell suspension collected into a 50ml conical centrifuge tube. Cells will be centrifuged at room temperature at 1,100 rpm for 5 min. The cell pellet will be carefully re-suspended into an appropriate volume of PBS (about 3ml/plate). The cells will be then counted using a hemocytometer and additional PBS will be added to give the appropriate number of cells (to a final volume of about 50µl/well).

cAMP standards and Detection Buffer (comprising 1 µCi of tracer [¹²⁵I] cAMP (50 µl) to 11 ml Detection Buffer) will be prepared and maintained in accordance with the manufacturer's instructions. Assay Buffer will be prepared fresh for screening and contained 50µl of Stimulation Buffer, 3µl of test compound (12µM final assay concentration) and 50µl cells, Assay Buffer will be stored on ice until utilized. The assay will be initiated by addition of 50µl of cAMP standards to appropriate wells followed by addition of 50µl of PBSA to wells H-11 and H12. Fifty µl of Stimulation Buffer will be added to all wells. DMSO (or selected candidate compounds) will be added to appropriate

AREN-0309

PATENT

wells using a pin tool capable of dispensing 3 μ l of compound solution, with a final assay concentration of 12 μ M test compound and 100 μ l total assay volume. The cells will then be added to the wells and incubated for 60 min at room temperature. One hundred μ l of Detection Mix containing tracer cAMP will then be added to the wells. Plates will be incubated for an additional 2 hours followed by counting in a Wallac MicroBeta™ scintillation counter. Values of cAMP/well will then be extrapolated from a standard cAMP curve which will be contained within each assay plate.

3. Cell-Based cAMP for G_i Coupled Target GPCRs

TSHR is a G_s coupled GPCR that causes the accumulation of cAMP upon activation. TSHR will be constitutively activated by mutating amino acid residue 623 (*i.e.*, changing an alanine residue to an isoleucine residue). A G_i coupled receptor is expected to inhibit adenylyl cyclase, and, therefore, decrease the level of cAMP production, which can make assessment of cAMP levels challenging. An effective technique for measuring the decrease in production of cAMP as an indication of constitutive activation of a G_i coupled receptor can be accomplished by co-transfecting, most preferably, non-endogenous, constitutively activated TSHR (TSHR-A623I) (or an endogenous, constitutively active G_s coupled receptor) as a "signal enhancer" with a G_i linked target GPCR to establish a baseline level of cAMP. Upon creating a non-endogenous version of the G_i coupled receptor, this non-endogenous version of the target GPCR is then co-transfected with the signal enhancer, and it is this material that can be used for screening. This approach will be utilized to effectively generate a signal when a cAMP assay is used; this approach is preferably used in the direct identification of candidate compounds against G_i coupled receptors. It is noted that for a G_i coupled GPCR, when this approach is used, an inverse agonist of the target GPCR will increase the cAMP signal and an agonist will decrease the cAMP signal.

On day one, 2x10⁴ 293 cells/well will be plated out. On day two, two reaction tubes will be prepared (the proportions to follow for each tube are per plate): tube A will be prepared by mixing 2 μ g DNA of each receptor transfected into the mammalian cells, for a total of 4 μ g DNA (*e.g.*, pCMV vector; pCMV vector with mutated TSHR (TSHR-A623I); TSHR-A623I and GPCR, *etc.*) in 1.2ml serum free DMEM (Irvine Scientific, Irvine, CA); tube B will be prepared by mixing 120 μ l lipofectamine (Gibco BRL) in 1.2ml serum free

AREN-0309

PATENT

DMEM. Tubes A and B will then be admixed by inversion (several times), followed by incubation at room temperature for 30-45min. The admixture is referred to as the "transfection mixture". Plated 293 cells will be washed with 1XPBS, followed by addition of 10ml serum free DMEM. 2.4ml of the transfection mixture will then be added to the cells, followed by incubation for 4hrs at 37°C/5% CO₂. The transfection mixture will then be removed by aspiration, followed by the addition of 25ml of DMEM/10% Fetal Bovine Serum. Cells will then be incubated at 37°C/5% CO₂. After 24hr incubation, cells will be harvested and utilized for analysis.

A Flash Plate™ Adenylyl Cyclase kit (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A) although designed for cell-based assays, can be modified for use with crude plasma membranes depending on the need of the skilled artisan. The Flash Plate wells will contain a scintillant coating which also contains a specific antibody recognizing cAMP. The cAMP generated in the wells can be quantified by a direct competition for binding of radioactive cAMP tracer to the cAMP antibody. The following serves as a brief protocol for the measurement of changes in cAMP levels in whole cells that express the receptors.

Transfected cells will be harvested approximately twenty four hours after transient transfection. Media will be carefully aspirated and discarded. Ten ml of PBS will be gently added to each dish of cells followed by careful aspiration. One ml of Sigma cell dissociation buffer and 3ml of PBS will be added to each plate. Cells will be pipetted off the plate and the cell suspension will be collected into a 50ml conical centrifuge tube. Cells will be centrifuged at room temperature at 1,100 rpm for 5 min. The cell pellet will be carefully re-suspended into an appropriate volume of PBS (about 3ml/plate). The cells will then be counted using a hemocytometer and additional PBS is added to give the appropriate number of cells (to a final volume of about 50µl/well).

cAMP standards and Detection Buffer (comprising 1 µCi of tracer [¹²⁵I] cAMP (50 µl] to 11 ml Detection Buffer) will be prepared and maintained in accordance with the manufacturer's instructions. Assay Buffer should be prepared fresh for screening and contained 50µl of Stimulation Buffer, 3µl of test compound (12µM final assay concentration) and 50µl cells, Assay Buffer can be stored on ice until utilized. The assay can be initiated by addition of 50µl of cAMP standards to appropriate wells followed by addition of 50µl of PBSA to wells H-11 and H12. Fifty µl of Stimulation Buffer will be added to all wells. Selected compounds (e.g., TSH) will be added to appropriate wells

AREN-0309**PATENT**

using a pin tool capable of dispensing 3µl of compound solution, with a final assay concentration of 12µM test compound and 100µl total assay volume. The cells will then be added to the wells and incubated for 60 min at room temperature. One hundred µl of Detection Mix containing tracer cAMP will then be added to the wells. Plates will then be incubated additional 2 hours followed by counting in a Wallac MicroBeta scintillation counter. Values of cAMP/well will then be extrapolated from a standard cAMP curve which is contained within each assay plate.

4. Reporter-Based Assays**a. CRE-LUC Reporter Assay (G_s-associated receptors)**

- 293 and 293T cells will be plated-out on 96 well plates at a density of 2×10^4 cells per well and will be transfected using Lipofectamine Reagent (BRL) the following day according to manufacturer instructions. A DNA/lipid mixture will be prepared for each 6-well transfection as follows: 260ng of plasmid DNA in 100µl of DMEM are gently mixed with 2µl of lipid in 100µl of DMEM (the 260ng of plasmid DNA consisted of 200ng of a 8xCRE-Luc reporter plasmid, 50ng of pCMV comprising endogenous receptor or non-endogenous receptor or pCMV alone, and 10ng of a GPRS expression plasmid (GPRS in pcDNA3 (Invitrogen)). The 8xCRE-Luc reporter plasmid is prepared as follows: vector SRIF-β-gal will be obtained by cloning the rat somatostatin promoter (-71/+51) at BglV-HindIII site in the pβgal-Basic Vector (Clontech). Eight (8) copies of cAMP response element will be obtained by PCR from an adenovirus template AdpCF126CCRE8 (*see, 7 Human Gene Therapy* 1883 (1996)) and cloned into the SRIF-β-gal vector at the Kpn-BglV site, resulting in the 8xCRE-β-gal reporter vector. The 8xCRE-Luc reporter plasmid will be generated by replacing the beta-galactosidase gene in the 8xCRE-β-gal reporter vector with the luciferase gene obtained from the pGL3-basic vector (Promega) at the HindIII-BamHI site. Following 30 min. incubation at room temperature, the DNA/lipid mixture will be diluted with 400 µl of DMEM and 100µl of the diluted mixture will be added to each well. One hundred µl of DMEM with 10% FCS will be added to each well after a 4hr incubation in a cell culture incubator. The following day the transfected cells will be changed with 200 µl/well of DMEM with 10% FCS. Eight hours later, the wells will be changed to 100 µl /well of DMEM without phenol red, after one wash with PBS. Luciferase activity will be measured the next day using the LucLite™ reporter gene assay kit (Packard) following manufacturer's

AREN-0309 **PATENT**
instructions and read on a 1450 MicroBeta™ scintillation and luminescence counter (Wallac).

b. API reporter assay (G_q -associated receptors)

5 A method to detect G_q stimulation depends on the known property of G_q -dependent phospholipase C to cause the activation of genes containing API elements in their promoter. A Pathdetect™ AP-1 cis-Reporting System (Stratagene, Catalogue # 219073) can be utilized following the protocol set forth above with respect to the CREB reporter assay, except that the components of the calcium phosphate precipitate were 410
10 ng pAP1-Luc, 80 ng pCMV-receptor expression plasmid, and 20 ng CMV-SEAP.

c. SRF-LUC Reporter Assay (G_q -associated receptors)

One method to detect G_q stimulation depends on the known property of G_q -dependent phospholipase C to cause the activation of genes containing serum response factors in their promoter. A Pathdetect™ SRF-Luc-Reporting System (Stratagene) can be
15 utilized to assay for G_q coupled activity in, e.g., COS7 cells. Cells are transfected with the plasmid components of the system and the indicated expression plasmid encoding endogenous or non-endogenous GPCR using a Mammalian Transfection™ Kit (Stratagene, Catalogue #200285) according to the manufacturer's instructions. Briefly,
410 ng SRF-Luc, 80 ng pCMV-receptor expression plasmid and 20 ng CMV-SEAP
20 (secreted) alkaline phosphatase expression plasmid; alkaline phosphatase activity is measured in the media of transfected cells to control for variations in transfection efficiency between samples) are combined in a calcium phosphate precipitate as per the manufacturer's instructions. Half of the precipitate is equally distributed between 3 wells in a 96-well plate, kept on the cells in a serum free media for 24 hours. The last 5
25 hours the cells are incubated with 1 μ M Angiotensin, where indicated. Cells are then lysed and assayed for luciferase activity using a Lucite™ Kit (Packard, Cat. # 6016911) and "Trilux 1450 Microbeta" liquid scintillation and luminescence counter (Wallac) as per the manufacturer's instructions. The data can be analyzed using GraphPad Prism™ 2.0a (GraphPad Software Inc.).

30 **d. Intracellular IP_3 Accumulation Assay (G_q -associated receptors)**

AREN-0309

PATENT

On day 1, cells comprising the receptors (endogenous and/or non-endogenous) are plated onto 24 well plates, usually 1×10^5 cells/well (although this number can be optimized). On day 2 cells are transfected by firstly mixing 0.25 μ g DNA in 50 μ l serum free DMEM/well and 2 μ l lipofectamine in 50 μ l serum free DMEM/well. The solutions are gently mixed and incubated for 15-30 min at room temperature. Cells are then washed with 0.5 ml PBS and 400 μ l of serum free media and then mixed with the transfection media and added to the cells. The cells are incubated for 3-4 hrs at 37°C/5%CO₂ and then the transfection media is removed and replaced with 1ml/well of regular growth media. On day 3 the cells are labeled with ³H-myo-inositol. Briefly, the media is removed and the cells are washed with 0.5 ml PBS. Then 0.5 ml inositol-free/serum free media (GIBCO BRL) are added/well with 0.25 μ Ci of ³H-myo-inositol/well and the cells incubated for 16-18 hrs overnight at 37°C/5%CO₂. On Day 4 the cells are washed with 0.5 ml PBS and 0.45 ml of assay medium is added containing inositol-free/serum free media 10 μ M pargyline 10 mM lithium chloride or 0.4 ml of assay medium and 50 μ l of 10x ketanserin (ket) to final concentration of 10 μ M. The cells are then incubated for 30 min at 37°C. The cells are then washed with 0.5 ml PBS and 200 μ l of fresh/ice cold stop solution (1M KOH; 18 mM Na-borate; 3.8 mM EDTA) is added to each well. The solution is kept on ice for 5-10 min (or until cells are lysed) and then neutralized by 200 μ l of fresh/ice cold neutralization solution (7.5 % HCL). The lysate is then transferred into 1.5 ml Eppendorf tubes and 1 ml of chloroform/methanol (1:2) is added/tube. The solution is vortexed for 15 sec and the upper phase is applied to a Biorad AG1-X8™ anion exchange resin (100-200 mesh). First, the resin is washed with water at 1:1.25 W/V and 0.9 ml of upper phase is loaded onto the column. The column is then washed with 10 ml of 5 mM myo-inositol and 10 ml of 5 mM Na-borate/60mM Na-formate. The inositol tris phosphates are eluted into scintillation vials containing 10 ml of scintillation cocktail with 2 ml of 0.1 M formic acid/ 1 M ammonium formate. The columns are regenerated by washing with 10 ml of 0.1 M formic acid/3M ammonium formate and rinsed twice with dd H₂O and stored at 4°C in water.

Reference is made to Figure 1. In Figure 1, 293 cells were transfected with G_q protein containing a six amino acid deletion, "G_q(del)"; G_q protein fused to a G_i protein, "G_q(del)/G_i"; endogenous RUP32; and RUP32 with G_q(del) ("RUP32+ G_q(del)/G_i"). The data indicate, based upon measuring IP₃ accumulation of RUP32 co-transfection of

AREN-0309**PATENT**

$G_q(\text{del})/G_i$ that RUP32 does not endogenously couple to G_q protein. However when RUP32 was co-transfected with $G_q(\text{del})/G_i$ fusion protein, RUP32 was forced to couple to G_q protein. RUP27+ $G_q(\text{del})/G_i$ evidence about a nine (9) fold increase in IP3 accumulation when compared to endogenous RUP32. This data demonstrates that

5 the $G_q(\text{del})/G_i$ Fusion Construct can be co-transfected with a GPCR and used to screen for agonists or inverse agonists.

Reference is made to Figure 2. In Figure 2, 293 cells were transfected with RUP35 and RUP36 receptor and compared to the control, pCMV. The data indicate that both RUP35 and RUP36 receptor are endogenously, constitutively active. RUP35 evidences

10 about a six (6) fold increase in intracellular inositol phosphate accumulation when compared to pCMV and RUP36 evidences about a four (4) fold increase when compared to pCMV.

Example 5**FUSION PROTEIN PREPARATION**

15 **a. GPCR: G_s Fusion Construct**

The design of the constitutively activated GPCR-G protein fusion construct can be accomplished as follows: both the 5' and 3' ends of the rat G protein $G_s\alpha$ (long form; Itoh, H. et al., 83 *PNAS* 3776 (1986)) is engineered to include a HindIII (5'-AAGCTT-3')

20 sequence thereon. Following confirmation of the correct sequence (including the flanking HindIII sequences), the entire sequence is shuttled into pcDNA3.1(-) (Invitrogen, cat. no. V795-20) by subcloning using the HindIII restriction site of that vector. The correct orientation for the $G_s\alpha$ sequence will be determined after subcloning into pcDNA3.1(-). The modified pcDNA3.1(-) containing the rat $G_s\alpha$ gene at HindIII sequence is then verified;

25 this vector will then be available as a "universal" $G_s\alpha$ protein vector. The pcDNA3.1(-) vector contains a variety of well-known restriction sites upstream of the HindIII site, thus beneficially providing the ability to insert, upstream of the G_s protein, the coding sequence of an endogenous, constitutively active GPCR. This same approach can be utilized to create other "universal" G protein vectors, and, of course, other commercially available or

30 proprietary vectors known to the artisan can be utilized. In some embodiments, the important criteria is that the sequence for the GPCR be upstream and in-frame with that of the G protein.

AREN-0309

PATENT

Spacers in the restriction sites between the G protein and the GPCR are optional. The sense and anti-sense primers included the restriction sites for XbaI and EcoRV, respectively, such that spacers (attributed to the restriction sites) exist between the G protein and the GPCR.

- 5 PCR will then be utilized to secure the respective receptor sequences for fusion within the G_{α} universal vector disclosed above, using the following protocol for each: 100ng cDNA for GPCR will be added to separate tubes containing 2 μ l of each primer (sense and anti-sense), 3 μ l of 10mM dNTPs, 10 μ l of 10XTaqPlus™ Precision buffer, 1 μ l of TaqPlus™ Precision polymerase (Stratagene: #600211), and 80 μ l of water. Reaction
- 10 temperatures and cycle times for the GPCR will be as follows with cycle steps 2 through 4 were repeated 35 times: 94°C for 1 min; 94°C for 30 seconds; 62°C for 20 sec; 72°C 1 min 40sec; and 72°C 5 min. PCR products will be run on a 1% agarose gel and then purified. The purified products will be digested with XbaI and EcoRV and the desired inserts purified and ligated into the G_{α} universal vector at the respective restriction sites. The
- 15 positive clones will be isolated following transformation and determined by restriction enzyme digestion; expression using 293 cells will be accomplished following the protocol set forth *infra*. Each positive clone for GPCR- G_{α} Fusion Protein will be sequenced to verify correctness.

b. G_{α} (6 amino acid deletion)/ G_i Fusion Construct

- 20 The design of a G_{α} (del)/ G_i fusion construct was accomplished as follows: the N-terminal six (6) amino acids (amino acids 2 through 7), having the sequence of TLESIM (SEQ.ID.NO.:47) $G_{\alpha q}$ -subunit was deleted and the C-terminal five (5) amino acids, having the sequence EYNLV (SEQ.ID.NO.:48) was replaced with the corresponding amino acids of the $G_{\alpha i}$ Protein, having the sequence DCGLF (SEQ.ID.NO.:49). This fusion construct
- 25 was obtained by PCR using the following primers:
 5'-gataAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGG-3' (SEQ.ID.NO.:50) and
 5'-gataGGATCCTTAGAACAGGCCGACATCCTCAGGTTTCAGCTGCAGGATGGTG-3' (SEQ.ID.NO.:51) and Plasmid 63313 which contains the mouse $G_{\alpha q}$ -wild type version with a hemagglutinin tag as template. Nucleotides in lower caps are included as spacers.
- 30 TaqPlus® Precision DNA polymerase (Stratagene) was utilized for the amplification by the following cycles, with steps 2 through 4 repeated 35 times: 95°C for 2 min; 95°C for 20 sec; 56°C for 20 sec; 72°C for 2 min; and 72°C for 7 min. The PCR

AREN-0309**PATENT**

product will be cloned into a pCRII-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced using the ABI Big Dye Terminator kit (P.E. Biosystems). Inserts from a TOPO clone containing the sequence of the fusion construct will be shuttled into the expression vector pcDNA3.1(+) at the HindIII/BamHI site by a 2 step cloning process.

5 Example 6**TISSUE DISTRIBUTION OF THE DISCLOSED HUMAN GPCRS: RT-PCR**

RT-PCR was applied to confirm the expression and to determine the tissue distribution of several novel human GPCRs. Oligonucleotides utilized were GPCR-specific and the human multiple tissue cDNA panels (MTC, Clontech) as templates. Taq DNA polymerase (Stratagene) were utilized for the amplification in a 40µl reaction according to the manufacturer's instructions. Twenty µl of the reaction will be loaded on a 1.5% agarose gel to analyze the RT-PCR products. Table E, below, lists the receptors, the cycle conditions and the primers utilized, and also lists exemplary diseases/disorders linked to the receptors.

TABLE E

Receptor Identifier	Cycle Conditions Min (*), Sec (*) Cycles 2-4 repeated 35 times	5' Primer (SEQ.ID.NO.)	3' Primer (SEQ.ID.NO.)	DNA Fragment	Tissue Expression
hRUP28	94°C for 5 min; 94°C for 30 sec; 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min	GTCTCACT GGTGGCCAT GTACTCC (52)	CTGCGTCCAC CAGAGTCAC GTCTCC (53)	710bp	heart; kidney; liver; lung and pancreas
hRUP29	94°C for 5 min; 94°C for 30 sec; 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min,	CTTGATGTT TGGGCTGCC CTTCTGC (54)	GTTGTGGCT AACGGCACA AAACACAAT TCC (55)	690bp	leukocyte and ovary

AREN-0309

PATENT

	and 72°C for 7 min				
hRUP30	94°C for 2 min; 94°C for 15 sec; 58°C for 20 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 10 min	CTGCTCAG GTTGACCGC TACACTGC (56)	GTGGCCATG AGCCACCCT GAGCTCC (57)	690bp	pancreas
hRUP31	95°C for 4 min; 95°C for 1 min; 52°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min	CTTCTCTCC GACGTCAAG G (58)	CCAAATCA GTGTGCAA ATCG (59)	516bp	colon, lung, pancreas, thymus; cerebral cortex, hippocampus of brain, and fat cells
hRUP32	95°C for 4 min; 95°C for 1 min; 52°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min	TGAATGGGT CCTGTGTGA AA (60)	CAACGGTCT GACAACCTC CT (61)	527bp	thymus
hRUP34	95°C for 4 min; 95°C for 1 min; 52°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min	TTGCTGTGAT GTGGCAITTT G (62)	CAGGAAGCC CATAAAGGC ATCAA (63)	534bp	peripheral blood leukocyte ("PBL"), prostate and kidney
hRUP35	95°C for 4 min; 95°C for 1 min; 52°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min	ACATCACCT GCTTCCTGA CC (64)	CCAGCATCTT GATGCAGTG T (65)	557bp	thalamus
hRUP37	95°C for 4 min; 95°C for 1 min; 52°C for 30 sec, 72°C for 1 min,	CCATCTCCA AAATCCTCA GTC (66)	GCTGTTAAG AGGGGACAG GAAA (67)	517bp	testis, cerebral cortex and hippocampus

AREN-0309

PATENT

	and 72°C for 7 min				
--	-----------------------	--	--	--	--

Diseases and disorders related to receptors located in these tissues or regions include, but are not limited to, cardiac disorders and diseases (e.g. thrombosis, myocardial infarction; atherosclerosis; cardiomyopathies); kidney disease/disorders (e.g., renal failure; renal tubular acidosis; renal glycosuria; nephrogenic diabetes insipidus; cystinuria; polycystic kidney disease); eosinophilia; leukocytosis; leukopenia; ovarian cancer; sexual dysfunction; polycystic ovarian syndrome; pancreatitis and pancreatic cancer; irritable bowel syndrome; colon cancer; Crohn's disease; ulcerative colitis; diverticulitis; Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD); Cystic Fibrosis; pneumonia; pulmonary hypertension; tuberculosis and lung cancer; Parkinson's disease; movement disorders and ataxias; learning and memory disorders; eating disorders (e.g., anorexia, bulimia, etc.); obesity; cancers; thymoma; myasthenia gravis; circulatory disorders; prostate cancer; prostatitis; kidney disease/disorders (e.g., renal failure; renal tubular acidosis; renal glycosuria; nephrogenic diabetes insipidus; cystinuria; polycystic kidney disease); sensorimotor processing and arousal disorders; obsessive-compulsive disorders; testicular cancer; priapism; prostatitis; hernia; endocrine disorders; sexual dysfunction; allergies; depression; psychotic disorders; migraine; reflux; schizophrenia; ulcers; bronchospasm; epilepsy; prostatic hypertrophy; anxiety; rhinitis; angina; and glaucoma. Accordingly, the methods of the present invention may also be useful in the diagnosis and/or treatment of these and other diseases and disorders.

Example 7**Protocol: Direct Identification of Inverse Agonists and Agonists****A. [³⁵S]GTP γ S Assay**

Although endogenous, constitutively active GPCRs have been used for the direct identification of candidate compounds as, e.g., inverse agonists, for reasons that are not altogether understood, intra-assay variation can become exacerbated. In some embodiments a GPCR Fusion Protein, as disclosed above, is also utilized with a non-endogenous, constitutively activated GPCR. When such a protein is used, intra-assay variation appears to be substantially stabilized, whereby an effective signal-to-noise ratio is

AREN-0309

PATENT

obtained. This has the beneficial result of allowing for a more robust identification of candidate compounds. Thus, in some embodiments it is preferred that for direct identification, a GPCR Fusion Protein be used and that when utilized, the following assay protocols be utilized.

5 **1. Membrane Preparation**

Membranes comprising the constitutively active orphan GPCR Fusion Protein of interest and for use in the direct identification of candidate compounds as inverse agonists or agonists are preferably prepared as follows:

a. Materials

10 “Membrane Scrape Buffer” is comprised of 20mM HEPES and 10mM EDTA, pH 7.4; “Membrane Wash Buffer” is comprised of 20 mM HEPES and 0.1 mM EDTA, pH 7.4; “Binding Buffer” is comprised of 20mM HEPES, 100 mM NaCl, and 10 mM MgCl₂, pH 7.4

b. Procedure

15 All materials will be kept on ice throughout the procedure. Firstly, the media will be aspirated from a confluent monolayer of cells, followed by rinse with 10ml cold PBS, followed by aspiration. Thereafter, 5ml of Membrane Scrape Buffer will be added to scrape cells; this will be followed by transfer of cellular extract into 50ml centrifuge tubes (centrifuged at 20,000 rpm for 17 minutes at 4°C). Thereafter, the supernatant will be
20 aspirated and the pellet will be resuspended in 30ml Membrane Wash Buffer followed by centrifugation at 20,000 rpm for 17 minutes at 4°C. The supernatant will then be aspirated and the pellet resuspended in Binding Buffer. The resuspended pellet will then be homogenized using a Brinkman Polytron™ homogenizer (15-20 second bursts until the material is in suspension). This is referred to herein as “Membrane Protein”.

25 **2. Bradford Protein Assay**

Following the homogenization, protein concentration of the membranes will be determined, for example, using the Bradford Protein Assay (protein can be diluted to about 1.5mg/ml, aliquoted and frozen (-80°C) for later use; when frozen, protocol for use will be as follows: on the day of the assay, frozen Membrane Protein is thawed at room
30 temperature, followed by vortex and then homogenized with a Polytron at about 12 x 1,000 rpm for about 5-10 seconds; it was noted that for multiple preparations, the homogenizer is thoroughly cleaned between homogenization of different preparations).

AREN-0309

PATENT

a. Materials

Binding Buffer (as discussed above); Bradford Dye Reagent; Bradford Protein Standard will be utilized, following manufacturer instructions (Biorad, cat. no. 500-0006).

b. Procedure

5 Duplicate tubes will be prepared, one including the membrane, and one as a control "blank". Each contains 800 μ l Binding Buffer. Thereafter, 10 μ l of Bradford Protein Standard (1mg/ml) will be added to each tube, and 10 μ l of membrane Protein will then be added to just one tube (not the blank). Thereafter, 200 μ l of Bradford Dye
10 Reagent will be added to each tube, followed by vortexing. After five minutes, the tubes will be re-vortexed and the material therein will be transferred to cuvettes. The cuvettes will then be read using a CECIL 3041 spectrophotometer, at wavelength 595.

3. Direct Identification Assay

a. Materials

15 GDP Buffer consisted of 37.5 ml Binding Buffer and 2mg GDP (Sigma, cat. no. G-7127), followed by a series of dilutions in Binding Buffer to obtain 0.2 μ M GDP (final concentration of GDP in each well was 0.1 μ M GDP); each well comprising a candidate compound, has a final volume of 200 μ l consisting of 100 μ l GDP Buffer (final concentration, 0.1 μ M GDP), 50 μ l Membrane Protein in Binding Buffer, and 50 μ l
20 [35 S]GTP γ S (0.6 nM) in Binding Buffer (2.5 μ l [35 S]GTP γ S per 10ml Binding Buffer).

b. Procedure

Candidate compounds will be preferably screened using a 96-well plate format (these can be frozen at -80°C). Membrane Protein (or membranes with expression vector excluding the GPCR Fusion Protein, as control), will be homogenized briefly until in
25 suspension. Protein concentration will then be determined using, for example, the Bradford Protein Assay set forth above. Membrane Protein (and controls) will then be diluted to 0.25mg/ml in Binding Buffer (final assay concentration, 12.5 μ g/well). Thereafter, 100 μ l GDP Buffer is added to each well of a Wallac Scintistrip™ (Wallac). A 5 μ l pin-tool will then be used to transfer 5 μ l of a candidate compound into such well (*i.e.*, 5 μ l in total assay
30 volume of 200 μ l is a 1:40 ratio such that the final screening concentration of the candidate compound is 10 μ M). Again, to avoid contamination, after each transfer step the pin tool is rinsed in three reservoirs comprising water (1X), ethanol (1X) and water (2X) -- excess

AREN-0309**PATENT**

liquid is shaken from the tool after each rinse and the tool is dried with paper and Kim wipes. Thereafter, 50 μ l of Membrane Protein will be added to each well (a control well comprising membranes without the GPCR Fusion Protein was also utilized), and pre-incubated for 5-10 minutes at room temperature. Thereafter, 50 μ l of [35 S]GTP γ S (0.6 nM) in Binding Buffer will be added to each well, followed by incubation on a shaker for 60 minutes at room temperature (again, in this example, plates were covered with foil). The assay will be stopped by spinning the plates at 4000 RPM for 15 minutes at 22°C. The plates will then be aspirated with an 8 channel manifold and sealed with plate covers. The plates will then be read on a Wallac 1450 using setting "Prot. #37" (as per manufacturer's instructions).

B. Cyclic AMP Assay

Another assay approach to directly identify candidate compound will be accomplished utilizing a cyclase-based assay. In addition to direct identification, this assay approach can be utilized as an independent approach to provide confirmation of the results from the [35 S]GTP γ S approach as set forth above.

A modified Flash Plate™ Adenylyl Cyclase kit (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A) will be preferably utilized for direct identification of candidate compounds as inverse agonists and agonists to GPCRs in accordance with the following protocol.

Transfected cells will be harvested approximately three days after transfection. Membranes will be prepared by homogenization of suspended cells in buffer containing 20mM HEPES, pH 7.4 and 10mM MgCl₂. Homogenization will be performed on ice using a Brinkman Polytron™ for approximately 10 seconds. The resulting homogenate will be centrifuged at 49,000 X g for 15 minutes at 4°C. The resulting pellet will then be resuspended in buffer containing 20mM HEPES, pH 7.4 and 0.1 mM EDTA, homogenized for 10 seconds, followed by centrifugation at 49,000 X g for 15 minutes at 4°C. The resulting pellet will then be stored at -80°C until utilized. On the day of direct identification screening, the membrane pellet will slowly be thawed at room temperature, resuspended in buffer containing 20mM HEPES, pH 7.4 and 10mM MgCl₂, to yield a final protein concentration of 0.60mg/ml (the resuspended membranes will be placed on ice until use).

cAMP standards and Detection Buffer (comprising 2 μ Ci of tracer [125 I] cAMP (100 μ l) to 11 ml Detection Buffer) will be prepared and maintained in accordance with the

AREN-0309**PATENT**

manufacturer's instructions. Assay Buffer will be prepared fresh for screening and contain 20mM HEPES, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 20mM phosphocreatine (Sigma), 0.1 units/ml creatine phosphokinase (Sigma), 50 μM GTP (Sigma), and 0.2 mM ATP (Sigma); Assay Buffer will be stored on ice until utilized.

5 Candidate compounds identified as per above (if frozen, thawed at room temperature) will be added, preferably, to 96-well plate wells (3μl/well; 12μM final assay concentration), together with 40 μl Membrane Protein (30μg/well) and 50μl of Assay Buffer. This admixture will be incubated for 30 minutes at room temperature, with gentle shaking.

10 Following the incubation, 100μl of Detection Buffer will be added to each well, followed by incubation for 2-24 hours. Plates will then be counted in a Wallac MicroBeta™ plate reader using "Prot. #31" (as per manufacturer instructions).

C. Melanophore Screening Assay

A method for identifying candidate agonists or inverse agonists for a GPCR can be
15 performed by introducing tests cells of a pigment cell line capable of dispersing or aggregating their pigment in response to a specific stimulus and expressing an exogenous clone coding for the GPCR. A stimulant, *e.g.*, light, sets an initial state of pigment disposition wherein the pigment is aggregated within the test cells if activation of the GPCR induces pigment dispersion. However, stimulating the cell with a stimulant to set an initial
20 state of pigment disposition wherein the pigment is dispersed if activation of the GPCR induces pigment aggregation. The tests cells are then contacted with chemical compounds, and it is determined whether the pigment disposition in the cells changed from the initial state of pigment disposition. Dispersion of pigments cells due to the candidate compound coupling to the GPCR will appear dark on a petri dish, while aggregation of pigments cells
25 will appear light.

Materials and methods will be followed according to the disclosure of U.S. Patent Number 5,462,856 and U.S. Patent Number 6,051,386, each of which are incorporated by reference.

Although a variety of expression vectors are available to those in the art, for
30 purposes of utilization for both the endogenous and non-endogenous human GPCRs, in some embodiments it is preferred that the vector utilized be pCMV. This vector was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) on October 13, 1998 (10801

AREN-0309**PATENT**

University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) under the provisions of the Budapest Treaty for the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure. The DNA was tested by the ATCC and determined to be viable. The ATCC has assigned the following deposit number to pCMV: ATCC #203351.

- 5 References cited throughout this patent document, including co-pending and related patent applications, unless otherwise indicated, are fully incorporated herein by reference. Modifications and extension of the disclosed inventions that are within the purview of the skilled artisan are encompassed within the above disclosure and the claims that follow.

AREN-0309

PATENT

CLAIMS

What is claimed is:

1. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
5 SEQ.ID.NO.:2.
2. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 1.
3. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:1.
4. A host cell comprising the plasmid of claim 3.
- 10 5. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:4.
6. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 5.
7. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:3.
- 15 8. A host cell comprising the plasmid of claim 7.
9. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:6.
10. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 9.
- 20 11. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:5.
12. A host cell comprising the plasmid of claim 11.
13. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:8.
- 25 14. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 13.
15. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:7.
16. A host cell comprising the plasmid of claim 15.
17. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:10.
- 30 18. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 17.
19. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:9.

AREN-0309

PATENT

20. A host cell comprising the plasmid of claim 19.
21. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:12.
22. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
5 receptor of claim 21.
23. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:11.
24. A host cell comprising the plasmid of claim 23.
25. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:14.
- 10 26. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 25.
27. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:13.
28. A host cell comprising the plasmid of claim 27.
29. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
15 SEQ.ID.NO.:16.
30. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 29.
31. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:15.
32. A host cell comprising the plasmid of claim 31.
- 20 33. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:18.
34. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 33.
35. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SEQ.ID.NO.:17.
- 25 36. A host cell comprising the plasmid of claim 35.
37. A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of
SEQ.ID.NO.:20.
38. A non-endogenous, constitutively activated version of the G protein-coupled
receptor of claim 37.
- 30 39. A plasmid comprising a vector and the cDNA of SE.ID.NO.:19.
40. A host cell comprising the plasmid of claim 39.

Figure 1

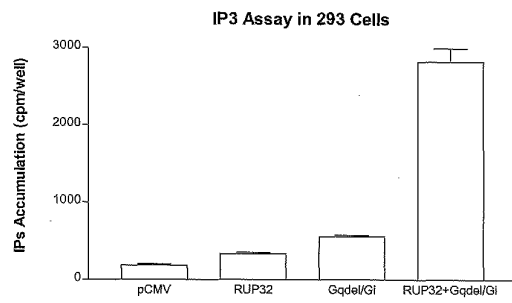
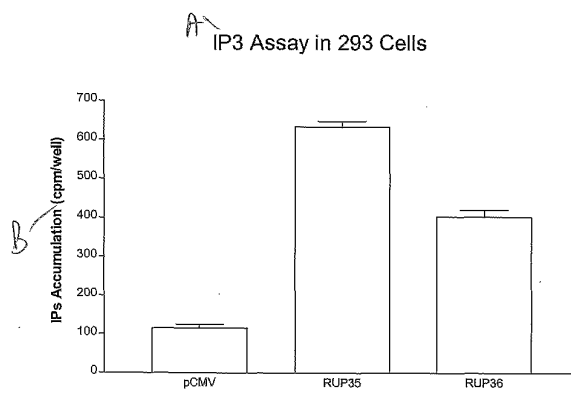


Figure 2



SEQUENCE LISTING

<110> Arena Pharmaceuticals, Inc.
<120> Endogenous And Non-Endogenous, Constitutively Activated Human G Protein-Coupled Receptors
<130> AREN-0309
<150> 09/170,496
<151> 1998-10-13
<150> PCT/US99/23938
<151> 1998-10-13
<150> 60/253,404
<151> 2000-11-27
<150> 60/255,366
<151> 2000-12-12
<150> 60/270,286
<151> 2001-02-20
<150> 60/282,365
<151> 2001-04-06
<150> 60/270,266
<151> 2001-02-20
<150> 60/282,032
<151> 2001-04-06
<150> 60/282,358
<151> 2001-04-06
<150> 60/282,356
<151> 2001-04-06
<150> 60/290,917
<151> 2001-05-14
<150> 60/309,208
<151> 2001-07-31
<160> 67
<170> PatentIn version.3.1
<210> 1
<211> 1002
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 1
atgtggagct gcagctgggt caacggcaca gggctggtgg aggagctgcc tgcctggcag 60
gacctgcagc tggggctgtc actgttgtcg ctgctgggcc tgggtggtgg cgtgccagtg 120
ggcctgtgct acaacgccct gctggtgctg gccaacctac acagcaaggc cagcatgacc 180
atgccggacg tgtactttgt caacatggca gtggcaggcc tgggtgctcag cgcctgggcc 240

```

cctgtgcacc tgetcgcccc cccgagctcc cggtagggcgc tgtggagtgt gggcggcgaa 300
gtccacgttg cactgcagat ccccttcaat gtgtccctac tggtagccat gtactccacc 360
gccctgtcta gccctgacca ctacatcgag cgtgcactgc cggggaccta catggccagc 420
gtgtacaaca cggggcagct gtgcggcttc gtgtgggggtg gcgcgctgct gaccagcttc 480
tcctogctgc tcttctacat ctgcagccat gtgtccaccc gcgcgctaga gtgcgccaag 540
atgcagaacg cagaagctgc cgaagccacg ctgggtgtta tgggtacgt ggtgcagca 600
ctggccaccc tctacgcgct ggtgtacttc tcccgcttc gcaggaggga caogccctg 660
gaccgggaca cgggcccgtt gtagcccttc gcacacagga tgetgggtgg caocgtgtc 720
acgcagtttg ggctctggac gccacactat ctgatcctgc tggggcacac ggtcatc 780
togcgaggga agcccgttga cgcacactac ctgggggtac tgcactttgt gaaggatttc 840
tccaaactcc tggccttctc cagcagcttt gtgacaccac ttctctacog ctacatgaac 900
cagagcttcc ccagcaagct ccaacggctg atgaaaaagc tgccctgcgg ggaacggcac 960
tgctccccgg accacatggg ggtgcagcag gtgctggcgt ag 1002

```

```

<210> 2
<211> 333
<212> FRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Novel Sequence

```

```

<400> 2

```

```

Met Trp Ser Cys Ser Trp Phe Asn Gly Thr Gly Leu Val Glu Glu Leu
1 5 10 15

```

```

Pro Ala Cys Gln Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Leu Leu
20 25 30

```

```

Gly Leu Val Val Gly Val Pro Val Gly Leu Cys Tyr Asn Ala Leu Leu
35 40 45

```

```

Val Leu Ala Asn Leu His Ser Lys Ala Ser Met Thr Met Pro Asp Val
50 55 60

```

```

Tyr Phe Val Asn Met Ala Val Ala Gly Leu Val Leu Ser Ala Leu Ala
65 70 75 80

```

```

Pro Val His Leu Leu Gly Pro Pro Ser Ser Arg Trp Ala Leu Trp Ser
85 90 95

```

```

Val Gly Gly Glu Val His Val Ala Leu Gln Ile Pro Phe Asn Val Ser
100 105 110

```

```

Ser Leu Val Ala Met Tyr Ser Thr Ala Leu Leu Ser Leu Asp His Tyr

```

```

115          120          125
Ile Glu Arg Ala Leu Pro Arg Thr Tyr Met Ala Ser Val Tyr Asn Thr
130          135          140
Arg His Val Cys Gly Phe Val Trp Gly Gly Ala Leu Leu Thr Ser Phe
145          150          155          160
Ser Ser Leu Leu Phe Tyr Ile Cys Ser His Val Ser Thr Arg Ala Leu
165          170          175
Glu Cys Ala Lys Met Gln Asn Ala Glu Ala Ala Asp Ala Thr Leu Val
180          185          190
Phe Ile Gly Tyr Val Val Pro Ala Leu Ala Thr Leu Tyr Ala Leu Val
195          200          205
Leu Leu Ser Arg Val Arg Arg Glu Asp Thr Pro Leu Asp Arg Asp Thr
210          215          220
Gly Arg Leu Glu Pro Ser Ala His Arg Leu Leu Val Ala Thr Val Cys
225          230          235          240
Thr Gln Phe Gly Leu Trp Thr Pro His Tyr Leu Ile Leu Leu Gly His
245          250          255
Thr Val Ile Ile Ser Arg Gly Lys Pro Val Asp Ala His Tyr Leu Gly
260          265          270
Leu Leu His Phe Val Lys Asp Phe Ser Lys Leu Leu Ala Phe Ser Ser
275          280          285
Ser Phe Val Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Tyr Met Asn Gln Ser Phe Pro
290          295          300
Ser Lys Leu Gln Arg Leu Met Lys Lys Leu Pro Cys Gly Asp Arg His
305          310          315          320
Cys Ser Pro Asp His Met Gly Val Gln Gln Val Leu Ala
325          330

<210> 3
<211> 918
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgcctggcc acnatacctc caggaattcc tcttgcatc ctatagtgac accccactta 60
atcagcctct acttcatagt gcttattggc gggctgggtg gtgtcatttc cattcttttc 120
ctcctggtga aatgaacac ccggtcagtg accaccatgg cggtcattaa cttggtggtg 180

```



```

gtccacagcg tttttctgct gacagtgcca ttctgcttga cctacctcat caagaagact 240
tggatgtttg ggcctgccctt ctgcaaatct gtgagtgcca tgcctcacat ccacatgtac 300
ctcacgttcc tattctatgt ggtgatccctg gtcaccagat acctcatctt cttcaagtgc 360
aaagacaaag tggdattcta cagaaaactg catgctgttg ctgccagtgc tggcatgttg 420
acgctggtga ttgtcattgt ggtacccctg gttgtctccc ggtatggaat ccatgaggaa 480
tacaatgagg agcaactgttt taaatttcac aaagagcttg cttacacata tgtgaaaatc 540
atcaactata tgaatgtcat tttgtcata gccgttgctg tgattctggt ggtcttccag 600
gtcttcatca ttatgttgat ggtgcagaag ctacyccact ctttactatc ccaccaggag 660
ttctgggctc agctgaaaaa cctatttttt ataggggtca tccttggttg ttctcttccc 720
taccagttct ttaggatcta ttaattgaat gttgtgacgc attccaatgc ctgtaacegc 780
aaggttgcat ttataacga aatcttcttg agtgtaacag caattagctg ctatgatttg 840
cttctctttg tctttggggg aagccattgg tttaagcaaa agataattgg cttatggaat 900
tgtgttttgt gccgttag 918

```

```

<210> 4
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4

```

```

Met Pro Gly His Asn Thr Ser Arg Asn Ser Ser Cys Asp Pro Ile Val
1 5 10 15

```

```

Thr Pro His Leu Ile Ser Leu Tyr Phe Ile Val Leu Ile Gly Gly Leu
20 25 30

```

```

Val Gly Val Ile Ser Ile Leu Phe Leu Leu Val Lys Met Asn Thr Arg
35 40 45

```

```

Ser Val Thr Thr Met Ala Val Ile Asn Leu Val Val His Ser Val
50 55 60

```

```

Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Tyr Leu Ile Lys Lys Thr
65 70 75 80

```

```

Trp Met Phe Gly Leu Pro Phe Cys Lys Phe Val Ser Ala Met Leu His
85 90 95

```

```

Ile His Met Tyr Leu Thr Phe Leu Phe Tyr Val Val Ile Leu Val Thr
100 105 110

```

```

Arg Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Cys Lys Asp Lys Val Glu Phe Tyr Arg
115 120 125

```

Lys Leu His Ala Val Ala Ala Ser Ala Gly Met Trp Thr Leu Val Ile
 130 135 140
 Val Ile Val Val Pro Leu Val Val Ser Arg Tyr Gly Ile His Glu Glu
 145 150 155 160
 Tyr Asn Glu Glu His Cys Phe Lys Phe His Lys Glu Leu Ala Tyr Thr
 165 170 175
 Tyr Val Lys Ile Ile Asn Tyr Met Ile Val Ile Phe Val Ile Ala Val
 180 185 190
 Ala Val Ile Leu Leu Val Phe Gln Val Phe Ile Ile Met Leu Met Val
 195 200 205
 Gln Lys Leu Arg His Ser Leu Leu Ser His Gln Glu Phe Trp Ala Gln
 210 215 220
 Leu Lys Asn Leu Phe Phe Ile Gly Val Ile Leu Val Cys Phe Leu Pro
 225 230 235 240
 Tyr Gln Phe Phe Arg Ile Tyr Tyr Leu Asn Val Val Thr His Ser Asn
 245 250 255
 Ala Cys Asn Ser Lys Val Ala Phe Tyr Asn Glu Ile Phe Leu Ser Val
 260 265 270
 Thr Ala Ile Ser Cys Tyr Asp Leu Leu Phe Val Phe Gly Gly Ser
 275 280 285
 His Trp Phe Lys Gln Lys Ile Ile Gly Leu Trp Asn Cys Val Leu Cys
 290 295 300
 Arg
 305
 <210> 5
 <211> 1125
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Novel Sequence
 <400> 5
 atgctgacag ggagctgcgg ggaccctcag aaaaagccac aggtgaccca ggactcaggg 60
 cccagagca tggggcttga gggacgagag acagctggcc agccacgagt gacctgctg 120
 cccacgccca acgtcagcgg gctgagccag gagtttgaaa gccactggcc agagatcgca 180
 gagaggtccc cgtgtgtggc tggcgtcacc cctgtcatct actacagtgt cctgctgggc 240

```

ttggggctgc ctgtcagcct cctgaccgca gtggccctgg cgcgccttgc caccaggacc 300
aggaggccct cctactacta ccttctggcg ctacacgcct cggctatcat catccaggtg 360
gtcatcgtgt tgcggggctt cctcctgcag ggagcagtgc tggcccgcca ggtgccccag 420
gctgtgggtg gcacggccaa catcctggag ttgtctgcca accacgcctc agtctggatc 480
gcatccttgc tcacggttga ccgtacact gccctgtgcc accccttgc ccatcgggcc 540
gcctcgtccc caggccggac cgcggggccc attgtctgtg tctgagtg gcctctgtt 600
accggcatcc ccttctactg gtggctggac atgtggagag acaccgactc acccagaaca 660
ctggacgagg tctcaagtg ggctcactgt ctactgtct atttcatccc ttgtgggtg 720
ttcttggtca ccaactcggc catcatccac cggctacgga ggaggggccg gagtgggtg 780
cagccccggg tgggcaagag cacagccatc ctctgggca tcaccacact gttcacctc 840
ctgtgggccc ccgggtctt cgtcatgctc taccacatgt acgtggcccc tgtccaccgg 900
gactggaggg tcacactggc ctggatgtg gccaatatgy tggccatgct ccacacggca 960
gccaaattcg gcctctactg cttgtcagc aagactttcc gggccactgt ccgacaggtc 1020
atcacagatg cctacctgcc ctgcacttg gcatacagc cagagggcac ggcggcggaag 1080
cctgtgatgg agcctccggg actcccccac ggggcagaag tgtag 1125

```

```

<210> 6
<211> 374
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Novel Sequence

```

```

<400> 6

```

```

Met Leu Thr Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gln Lys Lys Pro Gln Val Thr
1 5 10 15

```

```

Gln Asp Ser Gly Pro Gln Ser Met Gly Leu Glu Gly Arg Glu Thr Ala
20 25 30

```

```

Gly Gln Pro Arg Val Thr Leu Leu Pro Thr Pro Asn Val Ser Gly Leu
35 40 45

```

```

Ser Gln Glu Phe Glu Ser His Trp Pro Glu Ile Ala Glu Arg Ser Pro
50 55 60

```

```

Cys Val Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Tyr Tyr Ser Val Leu Leu Gly
65 70 75 80

```

```

Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Leu Thr Ala Val Ala Leu Ala Arg Leu
85 90 95

```

```

Ala Thr Arg Thr Arg Arg Pro Ser Tyr Tyr Tyr Leu Leu Ala Leu Thr

```

100	105	110
Ala Ser Asp Ile Ile Ile Gln Val Val Ile Val Phe Ala Gly Phe Leu 115 120 125		
Leu Gln Gly Ala Val Leu Ala Arg Gln Val Pro Gln Ala Val Val Arg 130 135 140		
Thr Ala Asn Ile Leu Glu Phe Ala Ala Asn His Ala Ser Val Trp Ile 145 150 155 160		
Ala Ile Leu Leu Thr Val Asp Arg Tyr Thr Ala Leu Cys His Pro Leu 165 170 175		
His His Arg Ala Ala Ser Ser Pro Gly Arg Thr Arg Arg Ala Ile Ala 180 185 190		
Ala Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu Thr Gly Ile Pro Phe Tyr Trp Trp 195 200 205		
Leu Asp Met Trp Arg Asp Thr Asp Ser Pro Arg Thr Leu Asp Glu Val 210 215 220		
Leu Lys Trp Ala His Cys Leu Thr Val Tyr Phe Ile Pro Cys Gly Val 225 230 235 240		
Phe Leu Val Thr Asn Ser Ala Ile Ile His Arg Leu Arg Arg Gly 245 250 255		
Arg Ser Gly Leu Gln Pro Arg Val Gly Lys Ser Thr Ala Ile Leu Leu 260 265 270		
Gly Ile Thr Thr Leu Phe Thr Leu Leu Trp Ala Pro Arg Val Phe Val 275 280 285		
Met Leu Tyr His Met Tyr Val Ala Pro Val His Arg Asp Trp Arg Val 290 295 300		
His Leu Ala Leu Asp Val Ala Asn Met Val Ala Met Leu His Thr Ala 305 310 315 320		
Ala Asn Phe Gly Leu Tyr Cys Phe Val Ser Lys Thr Phe Arg Ala Thr 325 330 335		
Val Arg Gln Val Ile His Asp Ala Tyr Leu Pro Cys Thr Leu Ala Ser 340 345 350		
Gln Pro Glu Gly Met Ala Ala Lys Pro Val Met Glu Pro Pro Gly Leu 355 360 365		

Pro Thr Gly Ala Glu Val
370

<210> 7
<211> 1086
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 7
atgtccactg aatgcgcgcg ggcagcgggc gacgcgcctc tgcgcagcct ggagcaagcc 60
aacgcacccc gctttccctt cttctccgac gtcaaggcgc accaccggct ggtgctggcc 120
gcggtggaga caaccgtgct ggtgctcctc ttgcagtggt cgctgctggg caacgtgtgc 180
gcctggtgct tgggtggcgcg ccgacgacgc cgcggcgcga ctgectgctt ggtactcaac 240
ctcttctgct cggacctgct ctccatcagc gctatccctc tgggtgctggc cgtgcgctgg 300
actgaggcct ggtgctggg cccggttgcc tgcacactgc tcttctacgt gatgacctg 360
agcggcagcg tcaccatcct cagcctggcc gcggtcagcc tggagcgcat ggtgtgcctc 420
gtgcacctgc agcgcggcgt gcggggctct gggcggcggg cgcgggcagt gctgctggcg 480
ctcatatggg gctattcggc ggtgcgcgct ctgcctctat cgctctctt ccgagtcgtc 540
ccgcaacggc tcgccggcgc cgaaccaggaa atttcgattt gcacactgat ttggcccaac 600
attcctggag agatctcgtg ggaagtctct ttgttactt tgaactctt ggtgcacgga 660
ctggtcattg tgatcagtta ctccaaaatt ttacagatca caaaggcctc aaggaaaggg 720
ctcacggtea gcttgcccta ctggagagc caccagatcc ggtgtccca gcaggacttc 780
cggctcttcc gcacctctt cctcctcatg gtctccttct tcatcatgtg gagcccccac 840
atcatcacca tctctctcat cctgatccag aactccaagc agacctggt catctggcgc 900
tcctcttctt tctgggtggt ggccttcaca ttgtctaatt cagccctaaa ccccatctc 960
tacaacatga cactgtgcag gaatgagtg aaaaaattt ttgtgtgctt ctggttccca 1020
gaaaaggagg ccattttaac agacacatct gtcaaaaaga atgacttgct gattatttct 1080
ggctaa 1086

<210> 8
<211> 361
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 8

Met Ser Thr Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
 20 25 30
 Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
 35 40 45
 Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
 50 55 60
 Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
 85 90 95
 Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
 100 105 110
 Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
 115 120 125
 Leu Ala Ala Val Ser Leu Glu Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
 130 135 140
 Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
 165 170 175
 Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
 180 185 190
 Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
 195 200 205
 Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
 210 215 220
 Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
 245 250 255
 Gln Gln Asp Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
 260 265 270
 Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu

275 280 285
 Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
 290 295 300
 Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
 305 310 315 320
 Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
 325 330 335
 Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
 340 345 350
 Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
 355 360

 <210> 9
 <211> 1038
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Novel Sequence

 <400> 9
 atgagcagca attcatccct gctggtggct gtgcagctgt gctacgcgaa cgtgaatggg 60
 tctgtgtga aatccccc ctgcgcggga tccgggtga ttctgtacat agtgtttggc 120
 ttggggctg tgcgtgctgt gtttggaac ctctgggtga tgatttcaat cctccatttc 180
 aagcagctgc actctccgac caattttctc gttgcctctc tggcctgcgc tgatttcttg 240
 gtgggtgtga ctgtgatgcc cttoagcatg gtcaggacgg tggagagctg ctggtatttt 300
 gggaggagtt ttgtacttt coacacctgc tgtgatgtgg cattttgtta ctcttctctc 360
 ttcaacttgt gcttcatctc catgacagc tacattgcgg ttactgacco cctggtctat 420
 cctaccaagt tcacgtatc tgtgtcagga atttgcata gcgtgtcctg gatcctgcc 480
 ctcatgtaca gcggtgctgt gttctacaca ggtgtctatg acgatgggt ggaggaaat 540
 tctgatgcc taaactgtat aggaggttgt cagaccgttg taaatcaaaa ctgggtgttg 600
 acagattttc tatcctctt tatacctacc tttattatga taattctgta tggtaacata 660
 ttcttctgtg ctgacgaca ggcgaaaan atagaaaata ctggtagcaa gacagaatca 720
 tcctcagaga gttacaaagc cagagtggcc aggagagaga gaaaagcagc taaaaccctg 780
 ggggtcacag tggtagcatt tatgatttca tggttacct atagcattga ttcaattaatt 840
 gatgccttta tgggtcttat aaccctgccc tgtatttatg agatttctg ttggtgtgct 900
 tattataact cagccatgaa tcctttgatt tatgctttat ttacccatg gtttaggaaa 960
 gcaataaaag ttattgtaac tggtcaggtt ttaagaaca gttcagcaac catgaatttg 1020

ttttctgaac atatataa

1038

<210> 10

<211> 345

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Novel Sequence

<400> 10

Met Ser Ser Asn Ser Ser Leu Leu Val Ala Val Gln Leu Cys Tyr Ala
1 5 10 15

Asn Val Asn Gly Ser Cys Val Lys Ile Pro Phe Ser Pro Gly Ser Arg
20 25 30

Val Ile Leu Tyr Ile Val Phe Gly Phe Gly Ala Val Leu Ala Val Phe
35 40 45

Gly Asn Leu Leu Val Met Ile Ser Ile Leu His Phe Lys Gln Leu His
50 55 60

Ser Pro Thr Asn Phe Leu Val Ala Ser Leu Ala Cys Ala Asp Phe Leu
65 70 75 80

Val Gly Val Thr Val Met Pro Phe Ser Met Val Arg Thr Val Glu Ser
85 90 95

Cys Trp Tyr Phe Gly Arg Ser Phe Cys Thr Phe His Thr Cys Cys Asp
100 105 110

Val Ala Phe Cys Tyr Ser Ser Leu Phe His Leu Cys Phe Ile Ser Ile
115 120 125

Asp Arg Tyr Ile Ala Val Thr Asp Pro Leu Val Tyr Pro Thr Lys Phe
130 135 140

Thr Val Ser Val Ser Gly Ile Cys Ile Ser Val Ser Trp Ile Leu Pro
145 150 155 160

Leu Met Tyr Ser Gly Ala Val Phe Tyr Thr Gly Val Tyr Asp Asp Gly
165 170 175

Leu Glu Glu Leu Ser Asp Ala Leu Asn Cys Ile Gly Gly Cys Gln Thr
180 185 190

Val Val Asn Gln Asn Trp Val Leu Thr Asp Phe Leu Ser Phe Phe Ile
195 200 205

Pro Thr Phe Ile Met Ile Ile Leu Tyr Gly Asn Ile Phe Leu Val Ala


```

210          215          220
Arg Arg Gln Ala Lys Lys Ile Glu Asn Thr Gly Ser Lys Thr Glu Ser
225          230          235          240
Ser Ser Glu Ser Tyr Lys Ala Arg Val Ala Arg Arg Glu Arg Lys Ala
245          250          255
Ala Lys Thr Leu Gly Val Thr Val Val Ala Phe Met Ile Ser Trp Leu
260          265          270
Pro Tyr Ser Ile Asp Ser Leu Ile Asp Ala Phe Met Gly Phe Ile Thr
275          280          285
Pro Ala Cys Ile Tyr Glu Ile Cys Cys Trp Cys Ala Tyr Tyr Asn Ser
290          295          300
Ala Met Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Lys
305          310          315          320
Ala Ile Lys Val Ile Val Thr Gly Gln Val Leu Lys Asn Ser Ser Ala
325          330          335
Thr Met Asn Leu Phe Ser Glu His Ile
340          345

<210> 11
<211> 1020
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 11
atgatgccct ttggccacaa tataattaat atttcctgtg tgaasacaa ctggtcaaat    60
gatgtccgtg cttccctgta cagtttaatg gtgtcctataa ttctgaccac actcgtttggc   120
aatctgatag ttattgtttc tatatcacac ttcaaacac ttcatacccc aacaaattgg   180
ctcattcatt ccattggccac tgtggacttt cttctggggt gtctgggtcat gccttacagt   240
atggtgagat ctgctgagca ctgttggtat ttggagaag tcttctgtaa aattcacaca   300
agcaaccgaca ttatgtgtgag ctacgcctcc attttccatt tgtctttcat ctccattgac   360
cgctactatg ctgtgtgtga tccactgaga tataaagcca agatgaatat ctggtttatt   420
tgtgtgatga tcttcattag ttggagtgtc cctgctgttt ttgcatttgg aatgatcttt   480
ctggagctaa acttcaaaag cgctgaagag atatattaca aacatgttca ctgcagagga   540
ggttgctctg tcttcttttag caaaatatct ggggtactga cctttatgac ttctttttat   600
atacctggat ctattatggt atgtgtctat tacagaatat atcttatcgc taaagaacag   660

```

```

gcaagattaa ttagtgatgc caatcagaag ctccaaattg gattggaat gaaaaatgga 720
atttcacaaa gcaaagaag gaaagctgtg aagacattgg ggattgtgat gggagttttc 780
ctaatatgct ggtgcccttt ctttatctgt acagtcattg acccttttct tcactacatt 840
attcoaccta ctttgaatga tgtattgatt tggtttggct acttgaactc tacatttsat 900
ccaatggttt atgcattttt ctatccttgg tttagaaaag cactgaagat gatgctgttt 960
ggtaaaattt tccaaaaaga ttcattccagg tgtaaatat ttttgaatt gagttcatag 1020

```

```

<210> 12
<211> 339
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Novel Sequence

```

```

<400> 12

```

```

Met Met Pro Phe Cys His Asn Ile Ile Asn Ile Ser Cys Val Lys Asn
1 5 10 15

```

```

Asn Trp Ser Asn Asp Val Arg Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Met Val Leu
20 25 30

```

```

Ile Ile Leu Thr Thr Leu Val Gly Asn Leu Ile Val Ile Val Ser Ile
35 40 45

```

```

Ser His Phe Lys Gln Leu His Thr Pro Thr Asn Trp Leu Ile His Ser
50 55 60

```

```

Met Ala Thr Val Asp Phe Leu Leu Gly Cys Leu Val Met Pro Tyr Ser
65 70 75 80

```

```

Met Val Arg Ser Ala Glu His Cys Trp Tyr Phe Gly Glu Val Phe Cys
85 90 95

```

```

Lys Ile His Thr Ser Thr Asp Ile Met Leu Ser Ser Ala Ser Ile Phe
100 105 110

```

```

His Leu Ser Phe Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Tyr Ala Val Cys Asp Pro
115 120 125

```

```

Leu Arg Tyr Lys Ala Lys Met Asn Ile Leu Val Ile Cys Val Met Ile
130 135 140

```

```

Phe Ile Ser Trp Ser Val Pro Ala Val Phe Ala Phe Gly Met Ile Phe
145 150 155 160

```

```

Leu Glu Leu Asn Phe Lys Gly Ala Glu Glu Ile Tyr Tyr Lys His Val
165 170 175

```

His Cys Arg Gly Gly Cys Ser Val Phe Phe Ser Lys Ile Ser Gly Val
 180 195 190
 Leu Thr Phe Met Thr Ser Phe Tyr Ile Pro Gly Ser Ile Met Leu Cys
 195 200 205
 Val Tyr Tyr Arg Ile Tyr Leu Ile Ala Lys Glu Gln Ala Arg Leu Ile
 210 215 220
 Ser Asp Ala Asn Gln Lys Leu Gln Ile Gly Leu Glu Met Lys Asn Gly
 225 230 235 240
 Ile Ser Gln Ser Lys Glu Arg Lys Ala Val Lys Thr Leu Gly Ile Val
 245 250 255
 Met Gly Val Phe Leu Ile Cys Trp Cys Pro Phe Phe Ile Cys Thr Val
 260 265 270
 Met Asp Pro Phe Leu His Tyr Ile Ile Pro Pro Thr Leu Asn Asp Val
 275 280 285
 Leu Ile Trp Phe Gly Tyr Leu Asn Ser Thr Phe Asn Pro Met Val Tyr
 290 295 300
 Ala Phe Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Lys Ala Leu Lys Met Met Leu Phe
 305 310 315 320
 Gly Lys Ile Phe Gln Lys Asp Ser Ser Arg Cys Lys Leu Phe Leu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Ser

<210> 13
 <211> 1029
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Novel Sequence

<400> 13
 atgaccagca atttttccca acctgttggtg cagctttgct atgaggatgt gaatggatct 60
 tgtattgaaa ctccctattc tctgggtcc cgggtaattc tgtacacggc gtttagcttt 120
 gggctcttgc tggctgtatt tggaaatctc ttagtaatga ctctgttct tcattttaag 180
 cagctgcact ctccaaccaa tttctcatt gccctctctg cctgtgctga ctcttggtga 240
 ggtgtgactg tgatgctttt cagcatggtc aggacggtag agagctgctg gtattttgga 300
 gccaaatttt gtactcttca cagttgctgt gatgtggcat ttgttactc ttctgtcttc 360

```

cacttggtgt tcatctgcat cgaacaggtac attgtgggta ctgatccccc ggtctatgct 420
accaagttca ccgtgtctgt gtogggaatt tgcacagcg tgccttgat tctgctctc 480
acgtacagcg gtgctgtgtt ctacacaggt gtcaatgatg atgggctgga ggaattagta 540
agtgtctca actgcgtagg tggctgtcaa attattgtaa gtcaaggctg ggtgttgata 600
gattttctgt tattcttcat aactacocct gttatgataa ttctttacag taagattttt 660
cttatagcta aacaacaagc tataaaatt gaaactacta gtacaaagt agaactatcc 720
tcagagagtt ataaatcag agtggccag agagagagga aagcagctaa aacctgggg 780
gtacaggtac tagcatttgt tatttcattg ttacogtata cagttgatat attaatgat 840
gcctttatgg gcttcctgac cctgcctat atctatgaaa ttgtctgtg agtgottat 900
tataactcag ccattgaatcc ttgatttat gctctattit atccttggtt taggaaagcc 960
ataaaactta ttttaagtg agatgttta aaggctagtt catcaacct tagtttattt 1020
ttagaataa 1029

```

```

<210> 14
<211> 342
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Novel Sequence

```

```

<400> 14

```

```

Met Thr Ser Asn Phe Ser Gln Pro Val Val Gln Leu Cys Tyr Glu Asp
1      5      10      15

```

```

Val Asn Gly Ser Cys Ile Glu Thr Pro Tyr Ser Pro Gly Ser Arg Val
20      25      30

```

```

Ile Leu Tyr Thr Ala Phe Ser Phe Gly Ser Leu Leu Ala Val Phe Gly
35      40      45

```

```

Asn Leu Leu Val Met Thr Ser Val Leu His Phe Lys Gln Leu His Ser
50      55      60

```

```

Pro Thr Asn Phe Leu Ile Ala Ser Leu Ala Cys Ala Asp Phe Leu Val
65      70      75      80

```

```

Gly Val Thr Val Met Leu Phe Ser Met Val Arg Thr Val Glu Ser Cys
85      90      95

```

```

Trp Tyr Phe Gly Ala Lys Phe Cys Thr Leu His Ser Cys Asp Val
100     105     110

```

```

Ala Phe Cys Tyr Ser Ser Val Leu His Leu Cys Phe Ile Cys Ile Asp
115     120     125

```

Arg Tyr Ile Val Val Thr Asp Pro Leu Val Tyr Ala Thr Lys Phe Thr
 130 135 140
 Val Ser Val Ser Gly Ile Cys Ile Ser Val Ser Trp Ile Leu Pro Leu
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Gly Ala Val Phe Tyr Thr Gly Val Asn Asp Asp Gly Leu
 165 170 175
 Glu Glu Leu Val Ser Ala Leu Asn Cys Val Gly Gly Cys Gln Ile Ile
 180 185 190
 Val Ser Gln Gly Trp Val Leu Ile Asp Phe Leu Leu Phe Phe Ile Pro
 195 200 205
 Thr Leu Val Met Ile Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Phe Leu Ile Ala Lys
 210 215 220
 Gln Gln Ala Ile Lys Ile Glu Thr Thr Ser Ser Lys Val Glu Ser Ser
 225 230 235 240
 Ser Glu Ser Tyr Lys Ile Arg Val Ala Lys Arg Glu Arg Lys Ala Ala
 245 250 255
 Lys Thr Leu Gly Val Thr Val Leu Ala Phe Val Ile Ser Trp Leu Pro
 260 265 270
 Tyr Thr Val Asp Ile Leu Ile Asp Ala Phe Met Gly Phe Leu Thr Pro
 275 280 285
 Ala Tyr Ile Tyr Glu Ile Cys Cys Trp Ser Ala Tyr Tyr Asn Ser Ala
 290 295 300
 Met Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Lys Ala
 305 310 315 320
 Ile Lys Leu Ile Leu Ser Gly Asp Val Leu Lys Ala Ser Ser Ser Thr
 325 330 335
 Ile Ser Leu Phe Leu Glu
 340

<210> 15
 <211> 1062
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Novel Sequence

<400> 15

```

atggagcaca cgcacgccca cctgcagcc aacagctcgc tctcttggtg gtccccggc 60
tcggcctgcg gcttgggttt cgtgccctg gtctactaca gccctctgct gtgcctcgg 120
ttaccagcaa atatcttgac agtgatcacc ctctcccagc tggtagcaag aagacagaag 180
tcctctcaca actatctctt ggcactcgtc gctgccgaca tcttggtcct ctttttcata 240
gtgtttgtgg acttctctgt ggaagatttc atcttgaaca tgcagatgcc tcaggtcccc 300
gacaagatca tagaagtgtt ggaattctca tccatccaca cctccatag gattactgta 360
ccgttaacca ttgacaggta tatogctgto tgcaccctgc tcaagtacca cccgtctca 420
taccacagccc gcaccgggaa agtcattgta agtgtttaca tcacotgctt cctgaccagc 480
atcccctatt actggtggcc caacatctgg actgaagact acatcagcac ctctgtgcat 540
caogtctcca tctggatcca ctgcttcacc gtctactcgg tgcctcgtc catctcttc 600
atctgaact caatcattgt gtaoaagctc agggaggaaga gcaattttcg tctcctggc 660
tactccacgg ggaagaccac cgcactcttg ttcacatata cctccatctt tgcacactt 720
tgggcccccc gcatcatcat gattctttac cactctatg gggcgcccat ccagaaccc 780
tggctggtgc acatcatgtc cgcattgccc aacatgctag cctctctgaa cccagccatc 840
aactctttcc tctactgctt catcagcaag cgtttccgca ccatggcagc cgcacogctc 900
aaggctttct tcaagtgcga gaagcaacct gtacagttct acaccaatca taactttcc 960
ataacaagta gccctggat ctgcgcggca aactcacact gcatcaagat gctggtgtac 1020
cagtatgaca aaatgggaa acctataaaa gtatccccgt ga 1062

```

```

<210> 16
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Novel Sequence

```

```

<400> 16

```

```

Met Glu His Thr His Ala His Leu Ala Ala Asn Ser Ser Leu Ser Trp
1          5          10          15
Trp Ser Pro Gly Ser Ala Cys Gly Leu Gly Phe Val Pro Val Val Tyr
20          25          30
Tyr Ser Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Pro Ala Asn Ile Leu Thr Val
35          40          45
Ile Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Arg Arg Gln Lys Ser Ser Tyr Asn
50          55          60
Tyr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Asp Ile Leu Val Leu Phe Phe Ile
65          70          75          80

```

Val Phe Val Asp Phe Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Asn Met Gln Met
 85 90
 Pro Gln Val Pro Asp Lys Ile Ile Glu Val Leu Glu Phe Ser Ser Ile
 100 105 110
 His Thr Ser Ile Trp Ile Thr Val Pro Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Ile
 115 120 125
 Ala Val Cys His Pro Leu Lys Tyr His Thr Val Ser Tyr Pro Ala Arg
 130 135 140
 Thr Arg Lys Val Ile Val Ser Val Tyr Ile Thr Cys Phe Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Ile Pro Tyr Tyr Trp Trp Pro Asn Ile Trp Thr Glu Asp Tyr Ile Ser
 165 170 175
 Thr Ser Val His His Val Leu Ile Trp Ile His Cys Phe Thr Val Tyr
 180 185 190
 Leu Val Pro Cys Ser Ile Phe Phe Ile Leu Asn Ser Ile Ile Val Tyr
 195 200 205
 Lys Leu Arg Arg Lys Ser Asn Phe Arg Leu Arg Gly Tyr Ser Thr Gly
 210 215 220
 Lys Thr Thr Ala Ile Leu Phe Thr Ile Thr Ser Ile Phe Ala Thr Leu
 225 230 235 240
 Trp Ala Pro Arg Ile Ile Met Ile Leu Tyr His Leu Tyr Gly Ala Pro
 245 250 255
 Ile Gln Asn Arg Trp Leu Val His Ile Met Ser Asp Ile Ala Asn Met
 260 265 270
 Leu Ala Leu Leu Asn Thr Ala Ile Asn Phe Phe Leu Tyr Cys Phe Ile
 275 280 285
 Ser Lys Arg Phe Arg Thr Met Ala Ala Ala Thr Leu Lys Ala Phe Phe
 290 295 300
 Lys Cys Gln Lys Gln Pro Val Gln Phe Tyr Thr Asn His Asn Phe Ser
 305 310 315 320
 Ile Thr Ser Ser Pro Trp Ile Ser Pro Ala Asn Ser His Cys Ile Lys
 325 330 335
 Met Leu Val Tyr Gln Tyr Asp Lys Asn Gly Lys Pro Ile Lys Val Ser

340 345 350

Pro

<210> 17
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Novel Sequence

<400> 17
 atggatccaa cgtcccagt ctccgtaca aaactgacac caatcaacgg acgtgaggag 60
 actccttgct acaatcagac cctgagcttc acygtgtga cgtgcatcat ttcccttgtc 120
 ggaactgacag gaaacgcggt agtgctctgg ctccctgggt acgcatcg caggaaacgt 180
 gtctccatct acatctctcaa cctggccgca gcagacttcc tcttctcag ctccagatt 240
 atacgttcgc cattacgct catcaatata agccatctca tccgaaaaa cctcgtttct 300
 gtgatgacct ttccctactt tacaggcctg agtatgtga gcgccatcag caccgagcgc 360
 tgctgtctg ttctgtggcc catctggtag cgtgcgcgc gccccacaca cctgcaagc 420
 gtgtgtgtg tctgtctgt gggcctgtcc ctgctgttta gtatgtgga gtggaggttc 480
 tgtgacttcc tgtttagtgg tgctgattct agttgggtg aaacgtcaga ttctatccca 540
 gtgcgtggc tgatttttt atgtgtggtt ctctgtgtt ccagcctggt cctgctggtc 600
 aggatcctct gtggatcccg gaagatgcgc ctgaccagcg tgtacgtgac catcctgctc 660
 acagtgtcgg tcttctctct ctgcggcctg cccttcggca ttctgggggc cctaatttac 720
 aggatgcacc tgaatttggg agtcttatat tgtcatgttt atctggtttg catgtccctg 780
 tcctctctaa acagtgtgc caaccccatc atttacttct tctggggctc ctttaggcag 840
 cytcaaaata ggcagacact gaagctgggt ctccagaggg ctctgcagga caagcctgag 900
 gtggataaag gtgaaggcca gcttctctgag gaaagcctgg agctgtcggg aagcagattg 960
 ggcccatga 969

<210> 18
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Novel Sequence

<400> 18
 Met Asp Pro Thr Val Pro Val Phe Gly Thr Lys Leu Thr Pro Ile Asn
 1 5 10 15
 Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Asn Gln Thr Leu Ser Phe Thr Val


```

      20          25          30
Leu Thr Cys Ile Ile Ser Leu Val Gly Leu Thr Gly Asn Ala Val Val
  35          40          45
Leu Trp Leu Leu Gly Tyr Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr
  50          55          60
Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Phe Gln Ile
  65          70          75          80
Ile Arg Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Ser His Leu Ile Arg Lys
  85          90          95
Ile Leu Val Ser Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Thr Gly Leu Ser Met
 100          105          110
Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile
 115          120          125
Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Thr His Leu Ser Ala Val Val Cys Val
 130          135          140
Leu Leu Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Met Leu Glu Trp Arg Phe
 145          150          155          160
Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Ser Trp Cys Glu Thr Ser
 165          170          175
Asp Phe Ile Pro Val Ala Trp Leu Ile Phe Leu Cys Val Val Leu Cys
 180          185          190
Val Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys
 195          200          205
Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val
 210          215          220
Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Leu Gly Ala Leu Ile Tyr
 225          230          235          240
Arg Met His Leu Asn Leu Glu Val Leu Tyr Cys His Val Tyr Leu Val
 245          250          255
Cys Met Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr
 260          265          270
Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys
 275          280          285

```

Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Lys Pro Glu Val Asp Lys Gly
290 295 300

Glu Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ser Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu
305 310 315 320

Gly Pro

<210> 19
<211> 969
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 19
atggattcaa ccatcccagt ctgggttaca gaactgaac caatcaacgg acgtgaggag 60
actccttget acaagcagac cctgagcttc acggggctga cgtgcatcgt ttcccttgtb 120
gcgctgacag gaacgcggtt tgtgtctctg ctccctgggt gccgcatcgc caggaaacgt 180
gtctccatct acatccctcaa cctggtcgcg gccgacttcc tcttccttag cggccacatt 240
atatgttcgc cgttacgcct catcaatata cgcacatccc tctccaaat cctcagtcct 300
gtgatgacct ttccctactt tataggceta agcatgtga gcccatcag caccgagcgc 360
tgcctgtcca tcctgtggcc catctggtag cactgccgcc gccccagata cctgtcatcg 420
gtcatgtgtg tctgtctctg ggccctgtcc ctgctgcgga gtatcctgga gtggatgttc 480
tgtgacttcc tgtttagtgg tgcgtattct gtttgggtg aaacgtcaga ttccattaca 540
atcgcgtggc tggttttttt atgtgtggtt ctctgtgggt ccagcctggc cctgctgttc 600
aggattctct gtgatcccg gaagatgcgc ctgaccaggc tgtacgtgac catcctcctc 660
acagtgcctg tcttccctct ctgtggcctg ccccttggca ttcatgtggc cctgttttcc 720
aggatccacc tggattggaa agtcttattt tgtcatgtgc atctagtctt cattttcctg 780
tccgctctta acagcagtcg caaccccatc atttacttct tctgtgggctc ctttaggcag 840
cgtcaaaata ggcagaacct gaagctggtt ctccagagg ctctgcagga cagcctgag 900
gtggatgaag gtggagggtg gcttctcag gaacccctgg agctgtcggg aagcagattg 960
gagcagtga 969

<210> 20
<211> 322
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 20

Met Asp Ser Thr Ile Pro Val Leu Gly Thr Glu Leu Thr Pro Ile Asn
 1 5 10 15
 Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Gly
 20 25 30
 Leu Thr Cys Ile Val Ser Leu Val Ala Leu Thr Gly Asn Ala Val Val
 35 40 45
 Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Ile Leu Asn Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Gly His Ile
 65 70 75 80
 Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Arg His Pro Ile Ser Lys
 85 90 95
 Ile Leu Ser Pro Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Met
 100 105 110
 Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Ile Leu Trp Pro Ile
 115 120 125
 Trp Tyr His Cys Arg Arg Pro Arg Tyr Leu Ser Ser Val Met Cys Val
 130 135 140
 Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Leu Glu Trp Met Phe
 145 150 155 160
 Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Val Trp Cys Glu Thr Ser
 165 170 175
 Asp Phe Ile Thr Ile Ala Trp Leu Val Phe Leu Cys Val Val Leu Cys
 180 185 190
 Gly Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys
 195 200 205
 Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val
 210 215 220
 Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Ala Leu Phe Ser
 225 230 235 240
 Arg Ile His Leu Asp Trp Lys Val Leu Phe Cys His Val His Leu Val
 245 250 255
 Ser Ile Phe Leu Ser Ala Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr

260 265 270

Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys
275 280 285

Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Thr Pro Glu Val Asp Glu Gly
290 295 300

Gly Gly Trp Leu Pro Gln Glu Thr Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu
305 310 315 320

Glu Gln

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 21
cagagctctg gtggccacct ctgtcc 26

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 22
ctgcgtccac cagagtcacg tctcc 25

<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 23
gtatgccttg ccacaatacc tccagg 26

<210> 24
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 24
gtttgtggct aacggcaca aacacattc c 31

```

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 25
ggtaaccacaa tgacaatcac cagcgtcc 28

<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 26
ggaacgtgag gtacatgtgg atgtgcagc 29

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 27
gcagtgtagc ggtaaccgt gagcagg 27

<210> 28
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 28
tgagcaggat ggcgatccag actgaggcgt gg 32

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 29
gaggtacagc tggcgatgct gacag 25

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 30
gtggccatga gccaccctga gctcc 25

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 31
ggaatgtcca ctgaatgctc gcgg 24

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 32
agctcgccag gtgtgagaaa ctgg 25

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 33
gcgttatgag cagcaattca tccctgctgg 30

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 34
gtatcctgaa ctctgtatat acaactgc 28

<210> 35
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 35
ccctcaggaa tgatgcctt ttgccaaa 29

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 36
atccatgtgg ttggtgcatg tggttcgt 28

<210> 37
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 37
aaacaacaaa cagcagaacc atgaccagc 29

<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 38
acatagagac aagtgacatg tgtgaaccac 30

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 39
ggtatgagac cgtgtggtac ttgagc 26

<210> 40
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Novel Sequence
<400> 40
gtggcagaca gcgatatacc tgtcaatgg 29

<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 41
gggtcatgg agcacacgca cgcacac 27

<210> 42
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 42
gaggcagtag ttgccacacc tatgg 25

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 43
catctgggtt gtgttccag gggcaccag 29

<210> 44
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 44
gacagtgttg ctctcaaat ccogtctgac tg 32

<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 45
ctgtttccag ggtcatcaga ctggg 25

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 46
gcagcattgc tctcaaatgc ctgtctg 27

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 47

Thr Leu Glu Ser Ile Met
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 48

Glu Tyr Asn Leu Val
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 49

Asp Cys Gly Leu Phe
1 5

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 50
gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gagg

34

<210> 51
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 51
gacggatcc ttagaacagg cgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg

53

```

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 52
gtcctcactg gtggccatgt actcc                25

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 53
ctgcgtccac cagagtcacg tctcc                25

<210> 54
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 54
cttggatggt tgggctgcc ttctgc                26

<210> 55
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 55
gtttgtggct aacggcaca aacacaattc c          31

<210> 56
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 56
ctgctcacgg ttgaccgcta cactgc                26

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 57
gtggccatga gccaccctga gctcc 25

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 58
cttcttctcc gacgtcaagg 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 59
cttcttctcc gacgtcaagg 20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 60
cttcttctcc gacgtcaagg 20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 61
caacggtctg acaacctctt 20

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence
<400> 62
ttgctgtgat gtggcatitt g 21

<210> 63
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 63
caggaagccc ataaagcat caa 23

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 64
acatcacctg cttcctgacc 20

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 65
ccagcatctt gatgcagtgt 20

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 66
ccatctccaa aatcctcagt c 21

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Novel Sequence

<400> 67
gctgttaaga gcggacagga aa 22

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

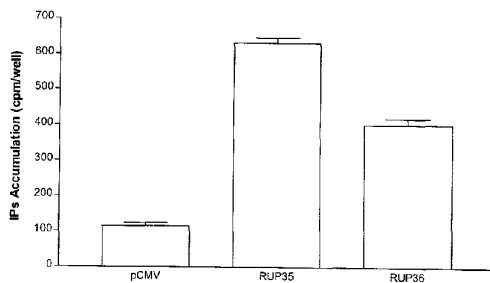
(10) International Publication Number
WO 02/042461 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/705
- (21) International Application Number: PCT/US01/44386
- (22) International Filing Date: 26 November 2001 (26.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|------------|-------------------------------|----|
| 60/253,404 | 27 November 2000 (27.11.2000) | US |
| 60/255,366 | 12 December 2000 (12.12.2000) | US |
| 60/270,266 | 20 February 2001 (20.02.2001) | US |
| 60/270,286 | 20 February 2001 (20.02.2001) | US |
| 60/282,032 | 6 April 2001 (06.04.2001) | US |
| 60/282,356 | 6 April 2001 (06.04.2001) | US |
| 60/282,358 | 6 April 2001 (06.04.2001) | US |
| 60/282,365 | 6 April 2001 (06.04.2001) | US |
| 60/290,917 | 14 May 2001 (14.05.2001) | US |
| 60/299,208 | 31 July 2001 (31.07.2001) | US |
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARENA PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 6166 Nancy Drive, San Diego, CA 92121 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CHEN, Ruoping [CN/US]; 5296 Timber Branch Way, San Diego, CA 92150 (US); CHU, Zhi, Liang [CN/US]; 11489 Creekside Lane, San Diego, CA 92128 (US); DANG, Huong, T. [VN/US]; 5352 Oak Park Drive, San Diego, CA 92105 (US); LOWITZ, Kevin, P. [US/US]; 8031 Caminito de Pizza, Apt. C, San Diego, CA 92108 (US); PRIDE, Cameron [US/US]; 11026 West Ocean Air Drive #1128, San Diego, CA 92130 (US).
- (74) Agents: STRAHER, Michael, P. et al.; Woodcock Washburn LLP, 46th floor, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: ENDOGENOUS AND NON-ENDOGENOUS VERSIONS OF HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

IP3 Assay in 293 Cells



(57) Abstract: The invention disclosed in this patent document relates to transmembrane receptors, more particularly to a human G protein-coupled receptor for which the endogenous ligand is unknown, and to mutated (non-endogenous) versions of the human GPCRs for evidence of constitutive activity.

WO 02/042461 A3

WO 02/042461 A3 

MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

— with international search report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:

12 September 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44386
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 00515 A (HYSEQ INC) 6 January 2000 (2000-01-06) page 4, line 16 -page 8, line 14 page 45, line 14 -page 49, line 26; figures 1,2	1-4
X	-& DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AAY78856 XP00222096 abstract	1-4
Y	DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AC073957 XP002221705 abstract	1-4
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see annexed) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 November 2002		Date of mailing of the international search report 24.06.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 540-3016		Authorized officer Strobel, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44386
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. BE731686 XP002221706 abstract	1-4
P, X	DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. BC014241 XP002221707 abstract	1-4
P, X	WO 01 62797 A (PARODI LUIS A ; LIND PETER (SE); UPJOHN CO (US); VOGELI GABRIEL (US) 30 August 2001 (2001-08-30) examples 1,2; tables 5,6	1-4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/44386
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 2 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p style="text-align: center;">1-4</p> <p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

International Application No. PCT/US 01 A4386

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 2

Present claim 2 relates to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being a constitutively activated G protein-coupled receptor

The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the hRUP28 protein carrying the point mutation V274K, as disclosed in example 2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 01/4386

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-4

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:2; non-endogenous, constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:1

2. Claims: 5-8

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:4; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:3

3. Claims: 9-12

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:6; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:5

4. Claims: 13-16

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:8; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:7

5. Claims: 17-20

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:10; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:9

6. Claims: 21-24

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:12; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:11

7. Claims: 25-28

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:14; non-endogenous constitutively

International Application No. PCT/US 01 A4386

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:13

8. Claims: 29-32

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:16; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:15

9. Claims: 33-36

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:18; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:17

10. Claims: 37-40

A G protein-coupled receptor encoded by an amino acid sequence of SEQ ID No:20; non-endogenous constitutively activated variants thereof; plasmids and host cells carrying the cDNA of SEQ ID No:19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 01/44386	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0000515	A	06-01-2000	AU 4820399 A	17-01-2000	
			WO 0000515 A2	06-01-2000	
			US 6472173 B1	29-10-2002	
WO 0162797	A	30-08-2001	AU 4165801 A	03-09-2001	
			AU 5787501 A	09-07-2001	
			CA 2394749 A1	05-07-2001	
			EP 1242454 A2	25-09-2002	
			EP 1265925 A2	18-12-2002	
			WO 0148015 A2	05-07-2001	
			WO 0162797 A2	30-08-2001	
			US 2002062013 A1	23-05-2002	
			US 2003003451 A1	02-01-2003	
			AU 4165501 A	03-09-2001	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 C 1 2 N 5/00 A

(31)優先権主張番号 60/270,286
(32)優先日 平成13年2月20日(2001.2.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/282,032
(32)優先日 平成13年4月6日(2001.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/282,356
(32)優先日 平成13年4月6日(2001.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/282,358
(32)優先日 平成13年4月6日(2001.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/282,365
(32)優先日 平成13年4月6日(2001.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/290,917
(32)優先日 平成13年5月14日(2001.5.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/309,208
(32)優先日 平成13年7月31日(2001.7.31)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 チェン, ルオピン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 5 0, サン ディエゴ, ティンバー ブランチ ウ
エイ 5 2 9 6

(72)発明者 チュ, ジ リアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 8, サン ディエゴ, クリークストーン レーン
1 1 4 8 9

(72)発明者 ダン, フオン ティー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 5, サン ディエゴ, オーク パーク ドライブ
5 3 5 2

(72)発明者 ローウィッツ, ケビン ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 8, サン ディエゴ, カミニト デ ピッツァ
8 0 3 1, アパートメント シー

(72)発明者 プライド, キャメロン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, ウェスト オーシャン エ
ア ドライブ 1 1 0 2 6 ナンバー 1 1 2 8

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA63 CA04 CA05 CA06 DA02 EA04 FA02 FA10 GA11
GA18 HA03 HA08 HA14

4B065	AA90X	AA93Y	AB01	AC14	BA02	BA25	CA24	CA46
4H045	AA10	BA10	CA40	DA50	EA50	FA72	FA74	